

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**POLIMORFISMOS DE *IL10*, *TNF*, *IFNG*, *HLA-DQB1* E *HLA-DRB1* E
ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE**

CURITIBA

2006

ENI PICCHIONI BOMPEIXE

**POLIMORFISMOS DE *IL10*, *TNF*, *IFNG*, *HLA-DQB1* E *HLA-DRB1* E
ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de Concentração Genética, sob orientação da Professora Doutora Maria da Graça Bicalho.

CURITIBA

2006

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Bompeixe, Eni Picchioni
Polimorfismos de IL10, TNF, IFNG, HLA-DQB1 e HLA-DRB1 e
abortamento recorrente. / Eni Picchioni Bompeixe. – Curitiba, 2006.
xv; 127f. : il. ; 30cm.

Orientador: Maria da Graça Bicalho

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética 2. Antígenos de histocompatibilidade HLA 3. Aborto
espontâneo I. Título II. Bicalho, Maria da Graça III. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Genética.

CDD(20.ed.) 575.1

FICHA DE APROVAÇÃO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética



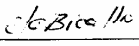
PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado, a que se submeteu **ENI PICCHIONI BOMPEIXE**, para fins de adquirir o título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito **"A"**.

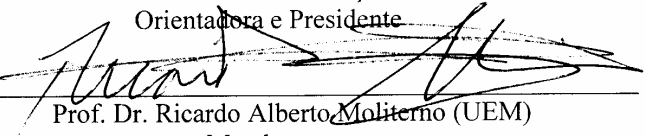
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 28 de junho de 2006.

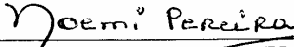
Banca Examinadora:



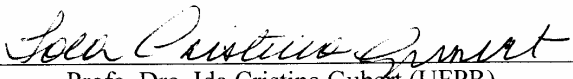
Prof. Dra. Maria da Graça Bicalho
Orientadora e Presidente



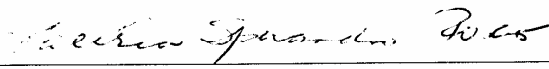
Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno (UEM)
Membro



Dra. Noemi Farah Pereira (HC/UFPR)
Membro



Prof. Dra. Ida Cristina Gubert (UFPR)
Membro



Prof. Dra. Valéria Sperandio Roxo (UFPR)
Membro

Visto: Prof. Dra. Chirlei Glienke-Blanco
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

*Aos meus pais, Salviana e Mario e
ao meu marido, Pedro Ernesto*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora no doutorado, Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Bicalho, não somente pela orientação, mas também por seus conselhos e amizade.

Ao LIGH pelo apoio financeiro e suporte técnico na condução deste trabalho, e à sua equipe, em especial àqueles que me auxiliaram no trabalho da tese, Alessandro Pirri, Clineu Uehara, Fabiana Poerner, Fernanda Ribas, Sonia Maria Correia Machado da Costa, Pablo Sandro Carvalho Santos, Renate von Linsingen, Rafael Gustavo Vargas e Téo Massignan Ruiz.

Ao Departamento de Genética, em especial às professoras que participaram da comissão de acompanhamento, Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Petzl-Erler, Prof^a. Dr^a. Valéria Sperandio Roxo e Prof^a. Dr^a. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro pelas sugestões e críticas, e ao Prof. Dr. Rui Fernando Pilotto pela colaboração no contato com suas pacientes.

Ao Dr. Salmo Raskin do Laboratório Genética, sem o qual não teria sido possível aumentar a amostra da pacientes com abortamento do LIGH, permitindo o contato com suas pacientes.

Aos meus colegas do Departamento de Patologia Básica, em especial à Prof^a. Dr^a. Ida Cristina Gubert pelo apoio ao assumir minhas aulas no Departamento de Patologia Básica para que eu tivesse mais tranquilidade para concluir este trabalho.

À minha grande amiga Prof^a. Juçara Damasceno Pereira pela correção do português e leitura criteriosa, com sugestões valiosas.

À Prof^a. Dr^a. Karin Braun pelo auxílio com programas estatísticos e sugestões.

Àqueles que com desprendimento e boa vontade participaram como controles, permitindo a realização deste trabalho.

Às pacientes com abortamento recorrente que depositam nas pesquisas tanta esperança.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE SIGLAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	2
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE E RESPOSTA IMUNE	4
3.1.1 Abortamento Espontâneo Recorrente e Suas Causas	4
3.1.2 Citocinas	6
3.1.3 A Citocina Interleucina-10 (IL-10) e o Gene <i>IL10</i>	7
3.1.3.1 Proteína, estrutura gênica, receptor e expressão do gene <i>IL10</i>	8
3.1.3.2 Biossíntese e função biológica da citocina IL-10	9
3.1.3.3 Polimorfismos e níveis de expressão do gene <i>IL10</i>	11
3.1.4 O Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e o Gene <i>TNF</i>	13
3.1.4.1 Biossíntese e papel biológico do TNF- α	13
3.1.4.2 Gene <i>TNF</i> : organização gênica, produtos moleculares, receptores e regulação gênica	14
3.1.4.3 Polimorfismo do gene <i>TNF</i>	18
3.1.5 A Citocina Interferon- γ e o Gene <i>IFNG</i>	19
3.1.5.1 O gene <i>IFNG</i> : organização gênica, produtos moleculares, receptores e regulação gênica	19
3.1.5.2 Biossíntese e papel biológico da citocina IFN- γ	21
3.1.5.3 Polimorfismo do gene <i>IFNG</i>	23
3.1.6 Abortamento Espontâneo Recorrente e MHC com Ênfase em <i>HLA-DQB1</i> e <i>HLA-DRB1</i>	24
3.1.7 O Paradigma Th1/Th2	27

3.1.8	Citocinas na Gravidez	28
3.1.9	Manutenção de um Desvio Th2 na Gravidez Normal	33
3.1.10	Contestação do Paradigma Th1/Th2	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	36
4.2	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	36
4.3	TIPIFICAÇÃO DOS ALELOS DE <i>IL10</i> , <i>TNF</i> e <i>IFNG</i> ATRAVÉS DA TÉCNICA PCR-SSP (REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA - INICIADORES SEQUÊNCIA-ESPECÍFICOS).....	37
4.3.1	Tipificação dos Alelos de <i>IL10</i> , <i>TNF</i> e <i>IFNG</i>	37
4.3.2	Interpretação dos Resultados para Tipificação dos Alelos de <i>IL10</i> , <i>TNF</i> e <i>IFNG</i>	40
4.3.2.1	Interpretação dos resultados para tipificação dos alelos de <i>IL10</i>	41
4.3.2.2	Interpretação dos resultados para tipificação dos alelos de <i>TNF</i>	42
4.3.2.3	Interpretação dos resultados para tipificação dos alelos de <i>IFNG</i>	43
4.4	TIPIFICAÇÃO DOS ALELOS DE <i>HLA-DQB1</i> PELA TÉCNICA PCR-SSP.....	43
4.4.1	Descrição do Método	43
4.5	TIPIFICAÇÃO DOS ALELOS DE <i>HLA-DRB1</i> PELA TÉCNICA PCR-SSP	44
5	ANÁLISE E TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS	47
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES ALÉLICAS DE <i>IL10</i> , <i>TNF</i> , <i>IFNG</i> , <i>HLA-DQB1</i> e <i>HLA-DRB1</i>	47
5.2	FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E HAPLOTÍPICAS	47
5.3	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE <i>IL10</i> , <i>TNF</i> , <i>IFNG</i> , <i>HLA-DQB1</i> e <i>HLA-DRB1</i> E ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE	47
6	RESULTADOS	49
6.1	GENES <i>IL10</i> (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), <i>TNF</i> (-308 G>A) e <i>IFNG</i> (+874 T>A)	49

6.1.1	Freqüências Alélicas de <i>IL10</i> (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), <i>TNF</i> (-308 G>A) e <i>IFNG</i> (+874 T>A) Entre Pacientes com RSA (N=61) e Mulheres-Controle (N=75)	49
6.1.2	Freqüências Genotípicas de <i>IL10</i> (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), <i>TNF</i> (-308 G>A) e <i>IFNG</i> (+874 T>A) e Comparação Entre Pacientes com RSA (N=61) e Mulheres-Controle (N=75).....	51
6.1.3	Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os Genes <i>IL10</i> (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), <i>TNF</i> (-308 G>A) e <i>IFNG</i> (+874 T>A)	52
6.1.4	Freqüências Genotípicas de <i>IL10</i> (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), <i>TNF</i> (-308 G>A) e <i>IFNG</i> (+874 T>A) Entre Pacientes Com RSA e Mulheres-Controle Agrupadas de Acordo com o Fenótipo “Produção de Citocinas” (Alto, Intermediário e Baixo)	53
6.2	FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>TNF</i> (-308 G>A) E <i>IFNG</i> (+874 T>A) CATEGORIZADOS COMO “PRÓ-INFLAMATÓRIOS” E RESPECTIVOS FENÓTIPOS “PRODUÇÃO DE CITOCINAS” (ALTO, INTERMEDIÁRIO E BAIXO) ENTRE PACIENTES COM RSA E MULHERES-CONTROLE.....	54
6.3	GENES <i>HLA-DQB1</i> E <i>HLA-DRB1</i>	55
6.3.1	Gene <i>HLA-DQB1</i>	55
6.3.1.1	Freqüências alélicas e dos grupos alélicos de <i>HLA-DQB1</i>	55
6.3.1.2	Freqüências genotípicas de <i>HLA-DQB1</i>	57
6.3.1.3	Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o gene <i>HLA-DQB1</i>	58
6.3.2	Gene <i>HLA-DRB1</i>	59
6.3.2.1	Freqüências alélicas e de grupos alélicos de <i>HLA-DRB1</i>	59
6.3.2.2	Equilíbrio de HARDY-WEINBERG para o gene <i>HLA-DRB1</i>	60
6.3.2.3	Freqüências haplotípicas de <i>HLA-DRB1/HLA-DQB1</i> em pacientes e controles	61
6.4	ALELOS DE <i>HLA-DRB1</i> E <i>IL-10</i> (-1082 G>A e -592 C>A), HAPLÓTIPOS DE <i>HLA-DRB1/TNF</i> (-308 G>A) E ALELOS DE <i>HLA-DRB1</i> E <i>IFNG</i> (+874 T>A)	62
6.4.1	Freqüências Alélicas de <i>HLA-DRB1</i> E <i>IL10</i> (-1082 G>A) em Pacientes e Mulheres-Controle	62

6.4.2	Freqüências Combinadas de <i>HLA-DRB1</i> E <i>IL10</i> (-592 C>A) em Pacientes e Controles	64
6.4.3	Freqüências Haplotípicas de <i>HLA-DRB1/TNF</i> (-308 G>A) em Pacientes com RSA e Mulheres-Controle	66
6.4.4	Freqüências Alélicas de <i>HLA-DRB1</i> E <i>IFNG</i> (+874 T>A) em Pacientes com RSA e Mulheres-Controle.....	68
7	DISCUSSÃO	71
7.1	FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DE <i>IL10</i> (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), <i>TNF</i> (-308 G>A) E <i>IFNG</i> (+874 T>A) NAS AMOSTRAS DE MULHERES-PACIENTES COM RSA E NAS MULHERES-CONTROLE	72
7.2	CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS <i>TNF-α</i> e <i>INF-γ</i>	74
7.3	GENES <i>HLA-DQB1</i> E <i>HLA-DRB1</i>	75
7.3.1	Alelos /Genótipos <i>HLA-DQB1</i> E RSA	75
7.3.2	Alelos/GenótipoS <i>HLA-DRB1</i> E RSA.....	77
7.3.3	Interações Gênicas Entre <i>HLA-DRB1</i> e <i>HLA-DQB1</i> , <i>IL10</i> (-1082 G>A, -592 C>A), <i>TNF</i> (-308 G>A) e <i>IFNG</i> (+874 T>A) no RSA.....	78
8	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICES	112
	APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	113
	APÊNDICE 2 - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PELA TÉCNICA DE <i>SALTING-OUT</i> (LAHIRI et al., 1991)	115
	ANEXOS	117
	ANEXO 1 - APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	118
	ANEXO 2 - FICHA DE ANÁLISE – CITOCINAS.....	119
	ANEXO 3 - FICHA DE ANÁLISE – <i>HLA-DQB1</i>	120
	ANEXO 4 - FICHA DE ANÁLISE PARA TIPIFICAÇÃO DE <i>HLA-DR</i>	121

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA IL-10 E DO IL-10R.....	8
FIGURA 2 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA REGIÃO DO MHC NO CROMOSSOMO 6 ONDE SE SITUAM OS <i>LOCI TNF</i> E <i>LTA</i>	15
FIGURA 3 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO TNF- α	16
FIGURA 4 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO IFN- γ	20
FIGURA 5 - MAPA ESQUEMÁTICO DO MHC	24
FIGURA 6 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO MHC E DO TCR.....	25
FIGURA 7 - TERMOCICLADOR <i>GENE AMP PERKIN ELMER PT-9700</i>	38
FIGURA 8 - PLACA DE ENSAIO COM 96 POÇOS <i>CYTOKINE GENOTYPING TRAY (ONE-LAMBDA, INC, CANOGA PARK, CA)^M</i>	38
FIGURA 9 - O PRODUTO DA PCR É TRANSFERIDO PARA O GEL.....	39
FIGURA 10 - GEL CONTENDO O RESULTADO DA PCR, VISUALIZADO APÓS COLORAÇÃO COM BROMETO DE ETÍDEO (a) E FOTOGRAFADO (b).....	40
FIGURA 11 - ESQUEMA DAS POSSÍVEIS BANDAS QUE PODEM SER OBSERVADAS NO GEL APÓS A CORRIDA ELETROFORÉTICA.....	40
FIGURA 12 - PADRÃO ELETROFORÉTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE <i>TNF</i>	42
FIGURA 13 - PADRÃO ELETROFORÉTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE <i>IFNG</i>	43
FIGURA 14 - PADRÃO ELETROFORÉTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE <i>HLA-DQB1</i>	45
FIGURA 15 - PADRÃO ELETROFORÉTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE <i>HLA-DRB1</i>	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1A - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>IL10</i> (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), <i>TNF</i> (-308 G>A) E <i>IFNG</i> (+874 T>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=61) E MULHERES-CONTROLE (N=75)	50
TABELA 1B - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE VARIANTES ALÉLICAS DE <i>IL10</i> (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), <i>TNF</i> (-308 G>A) E <i>IFNG</i> (+874 T>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=61) E MULHERES-CONTROLE (N=75).....	51
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>IL10</i> (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), <i>TNF</i> (-308 G>A) E <i>IFNG</i> (+874 T>A) ENTRE AS PACIENTES COM RSA (N=61) E MULHERES-CONTROLE (N=75)	52
TABELA 3 - EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG PARA OS GENES <i>IL10</i> (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), <i>TNF</i> (-308 G>A) e <i>IFNG</i> (+874 T>A).....	53
TABELA 4 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>IL10</i> (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), <i>TNF</i> (-308 G>A) e <i>IFNG</i> (+874 T>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=61) E MULHERES-CONTROLE (N=75) AGRUPADAS DE ACORDO COM O FENÓTIPO “PRODUÇÃO DE CITOCINAS”	54
TABELA 5 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS COMBINADAS DE <i>TNF</i> (-308 G>A) E <i>IFNG</i> (+874 T>A), CATEGORIZADAS CONFORME FENÓTIPOS “PRODUÇÃO DE CITOCINAS” ENTRE PACIENTES COM RSA (N=61) E MULHERES-CONTROLE (N=75)	55
TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE ALELOS DE <i>HLA-DQB1</i> ENTRE PACIENTES COM RSA (N=59) E MULHERES-CONTROLE (N=73).....	56
TABELA 7 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS PORTADORES DE GRUPOS ALÉLICOS DE <i>HLA-DQB1</i> ENTRE PACIENTES COM RSA (N=59) E MULHERES-CONTROLE (N=73).....	57
TABELA 8 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS (>0,01) DE <i>HLA-DQB1</i> ENTRE PACIENTES COM RSA (N=59) E MULHERES-CONTROLE (N=73).....	57
TABELA 9 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS (POR GRUPO ALÉLICO) DE <i>HLA-DQB1</i> ENTRE PACIENTES COM RSA (N=59) E MULHERES-CONTROLE (N=73).....	58

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS (>0,01) DE PORTADORES DE VARIANTES ALÉLICAS DE <i>HLA-DRB1</i> ENTRE PACIENTES COM RSA (N=59) E MULHERES-CONTROLE (N=72)	59
TABELA 11 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE GRUPO ALÉLICO DE <i>HLA-DRB1</i> ENTRE PACIENTES COM RSA (N=59) E MULHERES-CONTROLE (N=72)	60
TABELA 12 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS (>0,01) DE <i>HLA-DRB1/HLA-DQB1</i> ENTRE PACIENTES COM RSA (N=57) E MULHERES-CONTROLE (N=71)	61
TABELA 13 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DE <i>HLA-DRB1/HLA-DQB1</i> (GRUPOS ALÉLICOS) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=57) E MULHERES-CONTROLE (N=71)	62
TABELA 14 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE COMBINAÇÕES DE VARIANTES ALÉLICAS (>0,01) DE <i>HLA-DRB1</i> E <i>IL10</i> (-1082 G>A) ENTRE PACIENTES (N=58) COM RSA E MULHERES-CONTROLE (N=70)	63
TABELA 15 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE COMBINAÇÕES DE GRUPOS ALÉLICOS DE <i>HLA-DRB1</i> E VARIANTES ALÉLICAS DE <i>IL10</i> (-1082 G>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E MULHERES-CONTROLE (N=70).....	64
TABELA 16 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS (>0,01) DE PORTADORES DE COMBINAÇÕES DE VARIANTES ALÉLICAS DE <i>HLA-DRB1</i> E <i>IL10</i> (-592 C>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E MULHERES-CONTROLE (N=70)	65
TABELA 17 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE COMBINAÇÕES DE GRUPOS ALÉLICOS DE <i>HLA-DRB1</i> E VARIANTES ALÉLICAS DE <i>IL10</i> (-592 C>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E MULHERES-CONTROLE (N=70).....	66
TABELA 18 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS (>0,01) DOS HAPLÓTIPOS <i>HLA-DRB1/TNF</i> (-308 G>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E CONTROLES (N=70)	67
TABELA 19 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS <i>HLA-DRB1</i> (GRUPO ALÉLICO)/ <i>TNF</i> (-308 G>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E MULHERES-CONTROLE (N=70).....	68

TABELA 20 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS (>0,01) DOS PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DE <i>HLA-DRB1</i> E <i>IFNG</i> (+874 T>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E MULHERES-CONTROLE (N=70).....	69
TABELA 21 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DOS GRUPOS ALÉLICOS DE <i>HLA-DRB1</i> E ALELOS DE <i>IFNG</i> (+874 T>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E MULHERES-CONTROLE (N=70).....	70

LISTA DE SIGLAS

CD40	- gp (glicoproteína) 50
CD54	- ICAM-1(Molécula de Adesão Intercelular-1)
CD62L	- L-selectina
CD80	- B7.1
CD86	- B7.2
CSF-1	- Fator Estimulador de Colônias do tipo 1
<i>D-MIX</i>	- Mistura de Desoxirribonucleotídeos
DNAc	- Ácido Desoxirribonucléico complementar
dNTP	- Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
EBV	- Vírus Epstein Barr
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético
Fc	- Fração cristalizável (das imunoglobulinas)
G-CSF	- Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
GM-CSF	- Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos
HCG	- Hormônio Gonadotrofina Coriônica Humano
HLA	- Antígenos Leucocitários Humanos
HTLV-1	- Vírus da Leucemia T humana do tipo 1
ICAM-1	- Molécula de Adesão Intercelular-1
IFN- γ	- Interferon Gama
<i>IFNA</i>	- Gene que codifica a Citocina IFN- α
<i>IFNG</i>	- Gene que codifica a Citocina IFN- γ
IgE	- Imunoglobulina E
IgG	- Imunoglobulina G
IgG1	- Imunoglobulina G do subtipo 1
IgM	- Imunoglobulina M
<i>IL</i>	- gene que codifica a Interleucina (<i>IL6, IL10, etc.</i>)
IL	- Interleucina
JAK	- Janus Kinase
LAK	- Células Exterminadoras Ativadas por Citocinas
LGL	- (<i>Large Granular Lymphocytes</i>) - Linfócitos Grandes Granulares
LIF	- Fator Inibidor de Leucemia

LPL	- Lipoproteína-lipase
LPS	- Lipopolissacarídeo
LT- α	- Linfotoxina alfa
<i>LTA</i>	- (<i>TNFB</i> , <i>TNF-β</i> e <i>LT-α</i>) Linfotoxina alfa (gene)
<i>LTB</i>	- Linfotoxina beta (gene)
M-CSF	- Fator Estimulador de Colônias de Monócitos
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
NF κ B	- Fator Nuclear kappa B
NFAT	- Fator Nuclear de Células T Ativadas
NK	- Células Exterminadoras Naturais
PAF	- Fator Ativador de Plaquetas
PCR	- Reação de Polimerização em Cadeia
PCR-RFLP	- Reação de Polimerização em Cadeia - Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição
PCR-SSP	- Reação de Polimerização em Cadeia - Iniciadores Sequência-Específicos
PG-12	- Prostaglandina-12
PHA/PMA	- Fitohemaglutinina/Acetato Miristato Forbol
RAG1	- Genes Ativadores de Recombinação do tipo 1
<i>RAG2</i>	- Genes Ativadores de Recombinação do tipo 2
RNA _m	- Ácido Desoxiribonucleico mensageiro
RSA	- Abortamento Espontâneo Recorrente
SNP	- (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>) - Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SP1	- Fator comum de Transcrição - 1
SP3	- Fator comum de Transcrição - 3
STAT	- (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>) - Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
STR	- (<i>Short Tandem Repeat</i>) - Repetições Curtas em <i>Tandem</i>
T CD4 ⁺	- Linfócito T CD4 ⁺
T CD8 ⁺	- Linfócito T CD8 ⁺
T $\gamma\delta$	- Linfócitos T gama -delta
TBE	- Tampão Tris-Borato-EDTA

TCR	- Receptor da Célula T
TFA	- (<i>Tissue Factor Activity</i>) – Fator de Atividade Tissular
TGF- β	- Fator β Transformante do Crescimento
TGF β -2	- Fator β -2 Transformante do Crescimento
<i>TGFB</i>	- Fator β Transformante do Crescimento (gene)
Th0	- Células T Auxiliares do tipo zero
Th1	- Células T Auxiliares do tipo 1
Th2	- Células T Auxiliares do tipo 2
<i>TNF</i>	- Gene que codifica a Citocina TNF- α
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral alfa
TNF-RI	- Receptor do tipo I do TNF
TNF-RII	- Receptor do tipo II do TNF

RESUMO

A complicação mais comum na gravidez é o abortamento espontâneo, com cerca de 31-57% dos embriões humanos implantados sendo abortados antes de 14-20 semanas de gestação. O abortamento espontâneo recorrente (RSA) é definido como dois ou mais abortamentos espontâneos consecutivos, e a maioria deles (60-70%) permanece inexplicada. Existem estudos sugerindo que os genes HLA e os genes das citocinas podem ter um papel importante no RSA. Considerando alguns relatos que mostram uma correlação entre RSA e alelos HLA e SNPs de citocinas, este estudo teve como objetivo investigar a relação entre RSA com polimorfismos nos genes *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A), *IFNG* (+874 T>A), *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1*. A amostra incluiu sessenta e duas mulheres caucasóides com RSA de causa desconhecida e sem nenhuma gravidez prévia, todas com história de 2 ou mais abortos de primeiro trimestre. Os controles constaram de setenta e seis mulheres caucasóides saudáveis, que haviam tido pelo menos dois filhos. A abordagem foi estudo de associação caso-controle, o DNA foi extraído de sangue periférico pela técnica de *salting-out* e a identificação das variantes polimórficas de todos os genes investigados foi realizada pelo método da PCR-SSP. As frequências genotípicas das variantes alélicas de todos os genes analisados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg nas amostras de pacientes e de controles. Não foi observada associação significativa do RSA com as variantes das posições -1082, -819 e -592 do gene *IL10*, e tampouco com as variantes de *TNF* -308 e *IFNG* +874. Estes dados indicam que as variantes polimórficas destes genes não influenciam na predisposição ao RSA. Foi encontrada uma associação positiva entre RSA e o alelo *DRB1*1104*, o qual estava presente em 6% dos pacientes e em 1% dos controles ($p=0,045$; OR=6,76 [CI 95%=0,67-57,71]); e uma associação negativa entre RSA e o genótipo *HLA-DQB1*02/HLA-DQB1*03*, observado em 5,01% dos pacientes e em 20,55% dos controles ($p=0,011$; OR= 0,21[IC95%=0,06 – 0,75]). Estes resultados sugerem que o alelo *DRB1*1104* possa ser um fator genético de predisposição ao RSA, embora não possa ser descartada a possibilidade dele estar em desequilíbrio de ligação com o verdadeiro alelo de susceptibilidade. O genótipo *HLA-DQB1*02 / DQB1*03* parece conferir um efeito protetor ao RSA. Outros estudos com maior poder estatístico, em amostras de maior tamanho, são necessários para confirmar essa hipótese.

Palavras-chave: abortamento espontâneo recorrente, citocinas, HLA.

ABSTRACT

The most common complication of pregnancy is the spontaneous abortion, with about 31-57% of implanted embryos in humans being aborted before 14 to 20 weeks of gestation. Recurrent spontaneous abortion (RSA) is defined as two or more consecutive spontaneous abortion, and a high proportion (60-70%) of RSA remains unexplained. There are studies pointing to HLA genes as well as cytokine genes as playing a role in the RSA. Considering that some reports indicate a correlation between RSA with particular HLA alleles and certain single nucleotide polymorphisms of cytokine genes, the present study aimed at investigating the relationship between unexplained RSA with *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A), *IFNG* (+874 T>A), *HLA-DQB1* and *HLA-DRB1* gene polymorphisms. The sample included sixty-two caucasian women with unexplained RSA and no previous successful pregnancy, all of them with a history of ≥ 2 consecutive first-trimester unexplained miscarriages. The control group consisted of seventy-six healthy caucasian women, who had had at least two children. The approach was an association study in a case-control design. DNA was isolated from peripheral blood by salting out technique and typing of the polymorphic variants of all genes investigated in this study was performed by PCR-SSP. Genotypic frequencies of allelic variants of all analyzed genes were in Hardy-Weinberg equilibrium in both patient and control samples. No significant association of RSA was observed either with variants at positions -1082, -829 and -592 of *IL10* gene or with variants of *TNF* -308 and *IFNG* +874. These data show that polymorphic variants of these genes do not seem to influence in the predisposition to RSA. It was found a positive association between RSA and *DRB1*1104* allele which was present in 6% of patients and in 1% of controls ($p=0,045$; OR=6,76 [CI 95%=0,67-57,71]); and a negative association between RSA and *HLA-DQB1*02/HLA-DQB1*03* genotype which was seen in 5,01% of patients and 20,55% of controls ($p=0,011$; OR= 0,21[IC95%=0,06 – 0,75]). These results suggest that *DRB1*1104* may be a genetic factor predisposing to RSA, although the possibility of this allele being in linkage disequilibrium with the real susceptibility allele can not be disregarded. On the other hand, the *HLA-DQB1*02* and *HLA-DQB1*03* genotype seems to confer protection from RSA. Nonetheless, further studies that employ larger samples should be performed to confirm this hypothesis.

Key-words: recurrent spontaneous abortion, cytokines, HLA.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que comprometem a continuidade de uma gestação há um consenso a respeito da influência dos fatores endócrinos, genéticos, anatômicos, infecciosos, e mais recentemente, imunológicos. O sistema imune materno pode estimular ou inibir o crescimento e sobrevivência da unidade fetoplacentária, mas o mecanismo envolvido, os mediadores-chave, modo de ação e a extensão da influência do sistema imune sobre a gestação ainda são bastante obscuros (RAGHUPATHY e TANGRI, 1996).

As causas dos abortamentos espontâneos recorrentes (RSAs) são desconhecidas em aproximadamente 60 a 70% dos casos (CLARK e CHAOUAT, 1989; HILL, 1991).

Polimorfismos nos genes associados a fenótipos altos e baixos produtores de citocinas, incluindo *TNF*, *IFNG*, *IL10*, *IL6* e *TGFB1* têm sido descritos (WILSON et al., 1992; TURNER et al., 1997a; PERREY et al., 1998, 1999; PRAVICA et al., 1999).

Algumas mulheres, com RSAs idiopáticos, apresentam produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, como $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$ e níveis diminuídos de citocinas antiinflamatórias como a IL-10 (HILL, POLGAR e ANDERSON, 1995). As razões, para essas variações dos níveis de produção de citocinas, são desconhecidas.

Interações gênicas não-alélicas (epistasia), dentre as quais ações sinérgicas, antagônicas e complementares, são um fenômeno amplamente conhecido em genética. Nesse contexto, a investigação do polimorfismo nos genes HLA traria subsídios aos estudos relacionados à reprodução humana face às evidências de que produtos dos genes HLA, além de induzirem resposta aloimune materna, o que tem sido considerado como fator favorável à implantação e desenvolvimento embrionários, também influencia na produção de citocinas (WILSON et al., 1993).

Este estudo investiga a hipótese de variantes polimórficas dos genes *IL10*, *TNF*, *IFNG* e *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1* constituírem fatores predisponentes aos RSAs idiopáticos.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

- 2.1. Estimar e comparar as frequências alélicas, genotípicas e de portadores das variantes alélicas de *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308A>G), e *IFNG* (+874 T>A) entre mulheres-pacientes com RSA e mulheres-controle. Testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambas as amostras.
 - 2.1.1 Comparar as frequências dos genótipos responsáveis pelos diferentes níveis de produção das citocinas IL-10, TNF- α e IFN- γ , agrupados de acordo com o critério fenotípico de alto, intermediário e baixo produtor, entre mulheres-pacientes com RSA e mulheres-controle.
- 2.2 Estimar e comparar as frequências de combinações genotípicas de *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) agrupados conforme fenótipo “Produção de Citocinas) (alto, intermediário e baixo) entre mulheres-pacientes com RSA e mulheres-controle.
- 2.3 Estimar e comparar as frequências genotípicas e de portadores de alelos *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1*, bem como as frequências haplotípicas das variantes dos genes *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1*, entre mulheres-pacientes com RSA e mulheres-controle. Testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambas as amostras.
 - 2.3.1 Estimar e comparar as frequências dos haplótipos constituídos de alelos e também de grupos alélicos dos genes *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1* entre mulheres-pacientes com RSA e mulheres-controle.
- 2.4 Estimar e comparar as frequências de portadores de combinações de variantes alélicas de *HLA-DRB1* e de *IL-10* (-1082 G>A e -592 C>A), as frequências haplotípicas de *HLA-DRB1/TNF* (-308A>G) e as frequências de portadores de combinações alélicas de *HLA-DRB1* e *IFNG* (+874 T>A) entre mulheres-pacientes com RSA e mulheres-controle.

Essas análises nos permitem investigar se variantes alélicas ou genótipos de *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308A>G), *IFNG* (+874 T>A), *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1*, isoladamente ou em conjunto, constituem fatores de risco ao abortamento recorrente.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE E RESPOSTA IMUNE

3.1.1 Abortamento Espontâneo Recorrente e Suas Causas

Define-se abortamento espontâneo recorrente (RSA) como duas ou mais perdas espontâneas e consecutivas, que ocorrem até a vigésima semana do período gestacional (COULAM, 1986; BYRNE e WARD, 1994; COULAM e STERN, 1994).

Dados epidemiológicos dos RSAs evidenciam que a frequência de um aborto espontâneo ocorre em torno de 15%. Sendo assim, a chance de que um casal tenha dois abortos consecutivos seria $(15\%)^2$ ou 2,3%, enquanto três perdas poderiam ocorrer em $(15\%)^3$ ou 0,3% dos casais, considerando-se a independência dos eventos. A prevalência de casais com três RSAs varia de 0,4% a 1%, uma incidência mais alta do que aquela esperada ao acaso (WARBURTON e FRASER, 1964; COULAN e STERN, 1994; FORBES, 1997). Portanto, além de fatores não-genéticos, genes específicos devem estar contribuindo para a não-ocorrência da implantação do embrião e do conseqüente abortamento (COULAM, 1986). O percentual de abortamentos espontâneos atinge índices mais elevados (31 a 57%) quando gestações são investigadas pela β -HCG (gonadotrofina coriônica humana β) (EDMONDS et al., 1982; WILCOX et al., 1988).

As causas de perda gestacional recorrente podem ser divididas em quatro grandes categorias: (1) citogenéticas, 25%; (2) anatômicas, 25%; (3) hormonais, 10%, e (4) outras, 40% (dessas, cerca de 50% têm sido associadas a causas imunológicas) (ANSARI e KIRKPATRICK, 1998).

Anormalidades citogenéticas podem ser encontradas em mais de 50 a 60% das perdas gestacionais de primeiro trimestre, principalmente aquelas com idade gestacional entre seis a oito semanas (KAJII et al., 1980; STIRRAT, 1990a; b). As causas citogenéticas, entretanto, declinam com o avanço da gravidez, e, em torno da oitava semana de gestação, representam menos de 5% dos abortamentos espontâneos (CARP et al., 1990).

Anomalias anatômicas do corpo uterino (má-formações, leiomiomas e sinéquias) podem resultar em perda gestacional precoce, mas, em geral, são causas de aborto no segundo/terceiro trimestre. Alterações do útero (corpo e cérvix) também podem resultar em parto prematuro que ocasionam a morte fetal (CARP et al., 1990).

Anormalidades do ducto Mülleriano, como útero bicornes ou septado e leiomiomas, são as alterações anatômicas mais importantes associadas à perda gestacional recorrente (HASSIAKOS e ZOURLAS, 1990). Sinéquia uterina pode ser um fator que contribui com aproximadamente 5% dos casos, e ocorre normalmente em decorrência da utilização de algum tipo de instrumentação uterina, como curetagem, dispositivo intra-uterino ou miomectomia. Os fatores apontados como determinantes da perda gestacional quando há má-formação uterina, leiomiomas submucosos ou cicatriz intra-uterina, comprometem o suprimento sangüíneo para a implantação e crescimento fetal (LEES e SUTHERST, 1974; HEINONEN e PYSTYNEN, 1983; ROCK e MURPHY, 1986).

Com relação às causas hormonais, a principal causa de perda gestacional recorrente é a fase lútea inadequada, na qual o nível de progesterona, por ocasião da ovulação, é menor que 10 ng/mL (HENSLEIGH e FAINSTAT, 1979). Outras alterações endócrinas que poderiam afetar a gravidez são diabetes, hipotireoidismo, hipertireoidismo e hipercortisolemia (ANSARI e KIRKPATRICK, 1998).

Doenças infecciosas causadas por patógenos como: *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, *Varicella*, citomegalovírus, vírus da rubéola, herpes vírus, micoplasma, têm sido associadas às perdas gestacionais; no entanto, seus efeitos sobre o abortamento espontâneo recorrente não foram conclusivos (ANSARI e KIRKPATRICK, 1998).

Várias toxinas ambientais, como o álcool e componentes do tabaco, podem contribuir para o abortamento espontâneo (HARLAP e SHIONO, 1980; McDONALD, ARMSTRONG e SLOAN, 1992). Exposição a radiações ionizantes e algumas drogas quimioterápicas, também têm sido relacionadas como fatores de risco na gravidez (POLIFKA e FRIEDMAN, 1991).

Com relação às causas imunológicas, fatores auto-imunes, incluindo anticorpos antifosfolípidos, como anticorpos anticardiolipina e anticoagulante

lúpico estão relacionados às perdas gestacionais. Anticorpos antifosfolipídeos ligam-se a fosfolipídeos e, clinicamente, podem resultar em eventos tromboembólicos, incluindo infarto placentário. Estudos demonstram que mulheres com esses anticorpos apresentam 70% de risco de perda gestacional recorrente (INFANTE-RIVARD et al., 1991; BRANCH et al., 1992).

Ainda com relação às causas imunológicas, mecanismos aloimunes foram propostos como mediadores de perdas gestacionais recorrentes (FRASER, GRIMES e SCHULZ, 1993; COULAM, 1995). Nesse contexto, vários estudos investigaram o papel dos Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) do casal, sem resultados conclusivos. Mais recentemente, mudou-se o foco para mecanismos inflamatórios mediados por citocinas, face às evidências de que linfócitos de mulheres com história de RSA são direcionados para uma resposta de citocinas com padrão Th1(pró-inflamatória) diferentemente daquelas com gestações normais, nas quais se observa uma resposta antiinflamatória característica de linfócitos Th2 (WEGMANN et al., 1993).

3.1.2 Citocinas

Citocinas são polipeptídeos que atuam de forma não-enzimática, em concentrações nanomolares ou picomolares, regulando crescimento, diferenciação e função de várias células e linhagens celulares. Essas moléculas foram originalmente identificadas, descritas e denominadas de acordo com seu papel sobre células linfo-hematopoéticas (METCALF et al., 1989), mas, sabe-se que apresentam uma variedade de funções, atuando em processos fisiológicos e fisiopatológicos. O termo citocina se restringe às moléculas originalmente denominadas interleucinas, linfocinas, monocinas, fatores estimuladores de colônias, ou interferons, com base na sua origem ou ação sobre células do sistema hematopoético (ROBERTSON et al., 1994).

Há numerosas propriedades compartilhadas por essas moléculas:

- as citocinas são produzidas durante a fase efetora da imunidade inata e adaptativa, atuando como mediadoras e reguladoras da resposta imune e inflamatória;

- atuam sobre muitos tipos celulares diferentes (efeito pleiotrópico);
- costumam ter múltiplos e diferentes efeitos sobre a mesma célula-alvo;
- as ações das citocinas costumam ser redundantes;
- influenciam a função e síntese de outras citocinas;
- iniciam sua ação por ligação a receptores na superfície da célula-alvo;
- os níveis de produção das citocinas são controlados geneticamente (POCIOT et al., 1993).

As citocinas podem ser geralmente caracterizadas como tendo efeitos estimulantes (pró-inflamatórios) ou inibidores (anti-inflamatórios) (HAUSER, 1995), não se limitando ao sistema hematopoético, e exercem papel essencial em muitos outros sistemas fisiológicos, incluindo o processo reprodutivo (ROBERTSON et al., 1994).

A célula-alvo pode ser a mesma célula que secreta a citocina (ação autócrina), uma célula vizinha (ação parácrina) ou uma célula distante estimulada por meio de citocinas secretadas na circulação (ação endócrina) (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2000).

As ações das citocinas individuais são complexas, uma vez que elas agem em um microambiente repleto de uma população heterogênea de células em diferentes estágios de ativação (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2000), o que torna qualquer investigação que associe fenômenos relacionados à reprodução e citocinas um desafio.

3.1.3 A Citocina Interleucina-10 (IL-10) e o Gene *IL10*

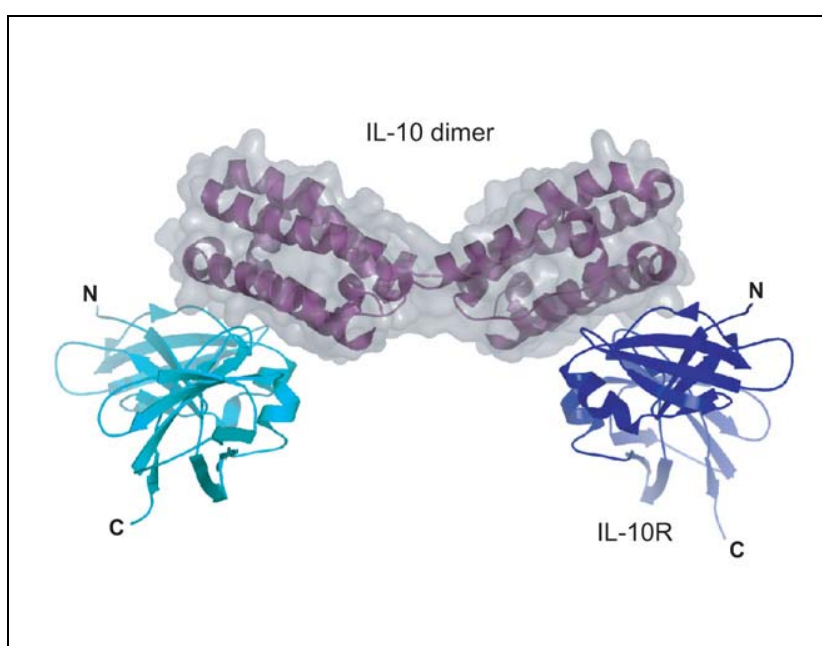
Em 1988, FIORENTINO et al. (1989) descreveram uma substância que estava presente no sobrenadante de cultivos celulares de linfócitos Th2, e que era capaz de inibir a produção de citocinas produzidas por células Th1 em cultivos celulares. Tal substância foi denominada Fator Inibidor da Síntese de Citocinas.

Posteriormente essa citocina passou a ser chamada "interleucina-10", uma vez que as análises imunoquímicas e bioquímicas indicaram que o Fator Inibidor da Síntese de Citocinas era uma nova citocina (MOORE et al., 1990).

3.1.3.1 Proteína, estrutura gênica, receptor e expressão do gene *IL10*

A IL-10, é uma estrutura homodimérica, com 18 kDa, sem carboidratos detectáveis, constituída por uma cadeia polipeptídica que se estrutura em quatro α -hélices (VIEIRA et al., 1991; WALTER et al., 1995; ZDANOV et al., 1995) (Figura 1).

FIGURA 1 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA IL-10 E DO IL-10R



Fonte:

<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/vol2004/issue231/images/large/2312004re7F8.jpeg>

O gene *IL10* contém cinco éxons e ocupa aproximadamente 5,1 kb no cromossomo 1 (KIM et al., 1992), entre 1q31 e 1q32 (ESKDALE et al., 1997a).

Em contraste com o que ocorre com os genes que codificam outras citocinas, a transcrição do gene *IL10* pode ser regulada por fatores transcricionais Sp1 e Sp3, expressos constitutivamente em diferentes tipos celulares. Esses fatores transcricionais ligam-se às seqüências-consenso ricas em G e C, presentes na região promotora do gene *IL10* (BRIGHTBILL et al., 2000; TONE et al., 2000).

Genes homólogos ao gene *IL10* foram identificados no genoma humano (JIANG et al., 1995, 1996; SU et al., 1998; DUMOUTIER et al., 2000; KNAPPE et

al., 2000; XIE et al., 2000;) e também no genoma de murinos (SOO et al., 1999; DUMOUTIER e RENAULD, 2002), mas suas atividades biológicas não estão bem caracterizadas. Foram também encontrados genes homólogos ao gene *IL10* no vírus Epstein-Barr (EBV) (MOORE et al., 1990; VIEIRA et al., 1991), herpesvírus tipo 2 eqüino (EHV2) (RODE et al., 1993), poxvírus Orf (FLEMING et al., 1997), e citomegalovírus humano (KOTENKO et al., 2000). Há evidência que os mesmos representam genes de origem animal que, incorporados ao genoma viral, permitiram interações particulares do vírus com o hospedeiro (MOSMANN, 1994; MOORE et al., 2001; JONES et al., 2002).

A IL-10 se liga ao seu receptor, IL-10R1, com alta afinidade ($k_d \sim 35\text{-}200$ pM) (HO et al., 1993; TAN et al., 1993). O IL-10R1 utiliza uma subunidade acessória para a sinalização, IL-10R2 (BACH, AGUET e SCHREIBER, 1997). A ativação que acontece após a ligação da IL-10 a seus receptores ocorre em função da regulação gênica e a via de ativação mais estudada é a JAK/STAT (STAT-Signal Transducer and Activator of Transcription, Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição) (SHUAI et al., 1992; YAMAMOTO et al., 1994; ZIHONG, WEN e DARNELL, 1994). A fosforilação das tirosinas-quinase desencadeia a dimerização de STATs que, deslocados para o núcleo, atuam sobre genes-alvo, podendo inibir a expressão dos genes que codificam outras citocinas, como *IFNA* e *IFNG* (ITO et al., 1999; YAMOAKA et al., 1999).

3.1.3.2 Biossíntese e função biológica da citocina IL-10

A maior parte das observações, evidências e fatos relacionados às citocinas baseiam-se em experimentos com murinos.

Os monócitos/macrófagos ativados são o tipo celular predominante responsável pela síntese da IL-10 (DE WAAL MALEFYT et al., 1991a).

A IL-10 também pode ser produzida por linfócitos Th2, linfócitos Th0 (FIORENTINO, BOND e MOSMANN, 1989), células B, principalmente após transformação pelo EBV (BURDIN et al., 1993), queratinócitos (ENK e KATZ, 1992) e células dendríticas (IWASAKI e KELSALL, 1999).

A IL-10 é uma citocina antiinflamatória que inibe a síntese de vários mediadores inflamatórios normalmente secretados por monócitos/macrófagos

ativados, tais como: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos), G-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos), M-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Monócitos), TNF (Fator de Necrose Tumoral), LIF (Fator Inibidor da Leucemia), PAF (Fator Ativador de Plaquetas), TFA (*Tissue Factor Activity* – Fator de Atividade Tissular) (DE WAAL MALEFYT et al., 1991a; FIORENTINO et al., 1991a, b; GRUBER, WILLIAMS e GERRARD, 1994), quimiocinas (BERKMAN et al., 1995; KOPYDLOWSKI et al., 1999; VELTROP et al., 2001) e PGE2 (prostaglandina-E2) (NIIRO et al., 1994, 1995).

Os monócitos/macrófagos parecem ser os alvos principais da IL-10 que inibe a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II, CD54 (ICAM-1), CD80 (B7), e CD86 (B7.2) em monócitos, mesmo após a indução dessas moléculas por IL-4 ou IFN- γ , reduzindo drasticamente a proliferação de linfócitos T (DE WAAL MALEFYT et al., 1991a,b; STEINBRINK et al., 1997, 1999, 2002). Ao contrário, a IL-10 estimula a expressão de receptores para a porção Fc de IgG (Imunoglobulinas G) em monócitos/macrófagos humanos, fato correlacionado com o aumento da sua capacidade fagocítica (TE VELDE et al., 1992; CAPSONI et al., 1995; SPITTLER et al., 1995).

Células dendríticas humanas e murinas se caracterizam pela sua capacidade de ativar células T em repouso e iniciar uma resposta imune (BANCHEREAU et al., 2000). Diferentes populações de células dendríticas produtoras de IL-10 foram identificadas nas placas de Peyer e no fígado, e estão associadas com a resposta do tipo Th2 que induz a um estado de tolerância (IWASAKI e KELSALL, 1999; KHANNA et al., 2000). Em geral, os efeitos da IL-10, sobre as células dendríticas são consistentes com inibição da resposta inflamatória Th1 (MOORE et al., 2001; McGUIRK, CANN e MILK, 2002).

A inibição das células Th1 pela IL-10 parece ser mediada via inibição da síntese de IL-12, um co-estimulador que é necessário para a produção de citocinas Th1 por células T e macrófagos (GERMANN, PARTENHEIMER e RUDE, 1990). A IL-10 inibe fortemente a produção da citocina IL-12, a qual pode induzir a síntese de IL-10 por células T, sugestivo de que o sistema imune é equipado com um mecanismo de *feedback* negativo relacionado à ativação das células T (MEYAARD et al., 1996).

Lipopolissacarídeo (LPS), TNF- α e leveduras opsonizadas induzem a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas pelos neutrófilos (CASSATELLA et al., 1993, 1994, 1997; GASPERINI et al., 1999). O LPS, no entanto, também pode estimular a síntese de IL-10 em macrófagos (LIU et al., 2006).

A IL-10, juntamente com a IL-3 e a IL-4, pode regular a manutenção e proliferação de mastócitos (THOMPSON-SNIPES et al., 1991).

A IL-10 pode inibir a produção de IgE, o que abre possibilidades do seu uso no tratamento de doenças alérgicas (ROYER et al., 2001; ARPS e KOLSH, 2002).

A manutenção da tolerância a aloantígenos é mantida pelos linfócitos TCD4+, e requer IL-10 para sua atividade funcional (HARA et al., 2001; BATTAGLIA et al., 2006).

O efeito inibidor da IL-10 é um importante fator limitante da duração e do dano patológico das respostas inflamatórias (MOORE et al., 2001; KENDALL et al., 2001; COOK et al., 2001; FANG et al., 2006).

3.1.3.3 Polimorfismos e níveis de expressão do gene *IL10*

Estudos familiares e de gêmeos sugerem que, aproximadamente, 75% da variação na produção da IL-10 é geneticamente determinada (WESTENDORP et al., 1997). Há diferenças significativas na capacidade de síntese de IL-10 após estimulação de sangue total com LPS em culturas *in vitro* (EDWARDS-SMITH et al., 1999).

Vários polimorfismos dentro da região promotora do gene *IL10* foram descritos como funcionais, incluindo duas repetições dinucleotídicas de citosina-adenina (CA) e três polimorfismos bialélicos na região promotora -1082, -819 e -592, designados a partir do sítio de início da transcrição (+1).

Com relação aos três polimorfismos bialélicos que foram identificados na região promotora -1082 (G>A), -819 (C>T) e -592 (C>A) ocorre desequilíbrio de ligação entre os mesmos e somente três de oito possíveis haplótipos (GCC, GCA, GTC, GTA, ACC, ACA, ATC e ATA) foram encontrados em populações caucasóides: GCC, ACC e ATA. Os genótipos -1082: GG, GA e AA, correspondem aos fenótipos alto, intermediário e baixo produtor da citocina IL-10, independente das variações nucleotídicas presentes nas posições -819 e -592 do gene *IL10* (KUBE et al., 1995;

ESKDALE et al., 1998; HURME, LAHDENPOHJA e SANTILLA, 1998; COOKSON et al., 1999; CRAWLEY et al., 1999; EDWARDS-SMITH et al., 1999; MORSE et al., 1999; PERREY et al., 1999; TAGORE et al., 1999).

Duas repetições dinucleotídicas (IL10.G e IL10.R microsátélites), localizadas a 1,1 e 4,0 kilobases a montante do sítio de transcrição (consideradas muito próximas ou realmente dentro do gene) são altamente polimórficas e atuam como elementos de ação cis na regulação da expressão do gene *IL 10* (ESKDALE et al., 1997b).

Há dados conflitantes na literatura com relação a polimorfismos no gene *IL10* e sua relação com RSA. Em uma pesquisa realizada na Finlândia, KARHUKORPI et al. (2001) analisaram 38 mulheres caucasóides com RSA e 131 mulheres-controle pareadas etnicamente e não encontraram diferenças com relação às frequências alélicas de *IL 10**-1082G e *IL 10**-1082A.

BABBAGE et al. (2001) investigaram o polimorfismo dos genes *TNF* (-308 G>A), *IL10* (-1082 G>A), *IFNG* (+874 T>A) em 43 mulheres com RSA e 73 controles caucasóides, e nenhuma associação foi encontrada. Nos estudos de DAHER et al. (2003) no que se refere ao polimorfismo dos genes *TNF* (-308 G>A), *IL10* (-1082 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) em 48 mulheres com RSA e 108 controles caucasóides relatam os seguintes resultados: associação significativa com o genótipo relacionado a alto produtor de INF- γ (+874 TT, OR=1,92 ρ =0,04) e IL-10 (-1082 GG, OR=1,75, ρ =0,03), e uma tendência para associação com os genótipos alto produtores de TNF- α (-308 AA a AG, OR=1,61, ρ =0,18). PRIGOSHIN et al. (2004), também com relação aos mesmos polimorfismos, analisaram 41 mulheres com RSA e 54 mulheres-controle e obtiveram os seguintes resultados: (1) não há evidência de associação com *TNF* e *IL10*, (2) associação significativa entre RSA versus controles no que concerne a *IFNG* (+874 T>A): o genótipo TA estava aumentado em pacientes em comparação com o grupo controle (65% versus 35,8%, ρ =0,01) e havia uma diminuição estatisticamente significativa na frequência do genótipo AA (baixo produtor) entre o grupo de pacientes em comparação com o grupo controle (20% versus 42,5%, ρ =0,04). KAMALI-SARVESTANI et al. (2005), no Irã, também investigaram polimorfismos relacionados aos genes *TNF* (-308 G>A), *IFNG* (+874 T>A) e *IL10* (-592 C>A, -819 C>T e -1082 G>A) em 139 pacientes com RSA e 143 mulheres-controle e os resultados permitiram concluir por associação positiva

significativa entre o genótipo CC de *IL 10* (-592 C>A) (63% nas pacientes e 46% nas mulheres-controle; OR=0,51, IC 95% [0,3-0,85]; $p<0,01$) e RSA.

3.1.4 O Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e o Gene *TNF*

3.1.4.1 Biossíntese e papel biológico do TNF- α

Além de sua atuação como componente da imunidade inata, o TNF- α tem papel central na resposta imune adaptativa dos vertebrados. A aquisição de dois genes ativadores de recombinação, *RAG1* e *RAG2*, há aproximadamente 450 milhões de anos, e que se expressam exclusivamente em linfócitos, propiciaram mecanismos somáticos que mediam recombinações que culminaram com o imenso repertório de receptores em linfócitos T e B (SCHATZ, OETTINGER e BALTIMORE, 1989; OETTINGER et al., 1990). No entanto, tais linfócitos não podem atuar individualmente, e o TNF- α é um dos responsáveis por estimulá-los para que os mesmos respondam a estímulos antigênicos. Essa citocina participa dos eventos inflamatórios e imunológicos e está relacionada a uma potente atividade imunomoduladora (STITES, TERR e PARSLOW, 2000).

As células mais importantes relacionadas à biossíntese do TNF- α são os monócitos e os macrófagos ativados (CARSWELL et al., 1975), mas essa citocina também pode ser sintetizada por outros tipos celulares, incluindo mastócitos (RICHARDS et al., 1988), basófilos (STEFFEN et al., 1989), eosinófilos (TAKANASHI et al., 1994), células NK (PETERS et al., 1986) e linfócitos T e B (KOBAYASHI, ASADA e OSAWA, 1997).

O TNF- α é importante na estruturação dos órgãos linfóides secundários, pois promove interações entre células hematopoéticas e mesenquimais (KORNER et al., 1997).

Em fibroblastos humanos, o TNF- α serve como um regulador positivo, estimulando várias atividades metabólicas em células normais (PFIZENMAIER et al., 1987).

Ao TNF- α têm sido atribuídas propriedades anticancerígenas pelos efeitos citolíticos e/ou citostáticos diretos sobre as células tumorais (CARSWELL et al., 1975; FALKENSAMMER C. et al., 2006)

Em sinergia com outras citocinas, tais como IL-1, o TNF- α participa da inflamação aguda e dos danos microvasculares incluindo a coagulação intravascular, estimulação da adesão de neutrófilos e monócitos em células endoteliais, e na síntese do PAF e da prostaglandina-12 (PG-12). A formação de trombos ocorre pela atividade pró-coagulante de TNF- α , inibindo a proteína C e a trombomodulina (proteína anticoagulante), e conseqüentemente bloqueando a dissolução da fibrina (MANTOVANI, BUSSOLINO e INTRONA, 1997).

O TNF- α também é conhecido como caquexina, baseado em experimentos realizados em coelhos infectados por parasitas, cujos resultados mostraram que esses animais desenvolviam uma grave perda de peso associada com hipertrigliceridemia e deficiência de lipoproteína-lipase (LPL), uma enzima envolvida na hidrólise de triglicerídeos (BEUTLER, MILKSARK e CERAMI, 1985).

TNF- α também está envolvido no choque séptico. As prostaglandinas estão envolvidas na ação tóxica do TNF- α . A indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas, fornece proteção contra os efeitos de choque induzidos pelo fator de necrose tumoral (OLD, 1987). O levamisole pode modular os níveis séricos de TNF- α , e é eficaz no tratamento de pacientes com ulcerações bucais herpetiformes recorrentes (SUN et al., 2006).

TNF- α , LT- α e IFN- γ podem aumentar a expressão de moléculas HLA de classes I e II de superfície celular de células endoteliais (JOHNSON e POBER; 1990 a, b).

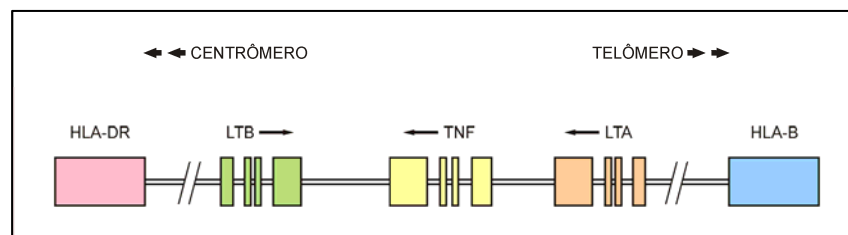
TNF- α também intensifica a secreção de IL-8, promovendo a aderência de neutrófilos ativados ao endotélio. Muitos efeitos do TNF- α como mediador da inflamação podem ser atribuídos à sua capacidade em estimular neutrófilos (BARBARA, VAN OSTAD e LOPEZ, 1996).

3.1.4.2 Gene *TNF*: organização gênica, produtos moleculares, receptores e regulação gênica

A família TNF inclui o gene *LTB* clonado por BROWNING et al. (1993) e que codifica a linfotoxina β , o gene *TNF* (anteriormente *TNF- α* , *TNF-A*) e o gene *LTA*, este último anteriormente referido como *TNFB*, *TNF- β* e *LT- α* . Esses genes

se posicionam em *tandem* em 6p21.3, ocupando um segmento de aproximadamente 7 kb na região de classe III do MHC (NEDWIN et al., 1985; SHIRAI et al., 1985; RINK e KIRCHNER, 1996). O gene *TNF* é flanqueado pelos genes *LTB* e *LTA*, codifica a citocina TNF- α e situa-se a 1,2 kb do gene *LTA* que codifica para a citocina LT- α (INOKO e TROWSDALE, 1987) (Figura 2).

FIGURA 2 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA REGIÃO DO MHC NO CROMOSSOMO 6 ONDE SE SITUAM OS *LOC*I *TNFE* *LTA*



NOTA – Modificado de RINK, L.; KIRCHNER, H. Recent progress in the tumor necrosis factor- α field. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.111, p.199-209, 1996.

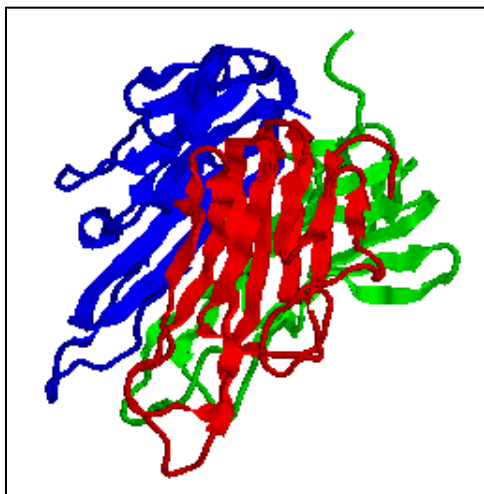
A família gênica TNF assemelha-se em organização, estruturando-se em quatro éxons e três íntrons compreendendo individualmente segmentos genômicos de 2,7 a 3,6 kb, com diferentes seqüências flanqueadoras nas extremidades 5' e 3', que ligam diferentes fatores transcripcionais, o que se reflete em expressão gênica distinta (NEDWIN et al., 1985; OLIFF, 1988; ECONOMOU et al., 1989).

O produto gênico de *TNF* é o TNF- α ou uma proteína de membrana tipo II, similar à LT- α e ao ligante do CD40 (FARRAH e SMITH, 1992; HOLLENBAUGH et al., 1992).

TNF- α (Figura 3) é sintetizado inicialmente como um polipeptídeo de 26 kDa e 233 aminoácidos com uma pré-seqüência de 76 aminoácidos que é clivada algumas horas depois de estar ancorada na membrana celular por metaloproteinases altamente específicas. Sem a pré-seqüência, seu peso molecular é 17 kDa e possui 157 resíduos de aminoácidos. Assim sendo, pode apresentar-se nas formas solúvel ou ligada à membrana (forma não-processada com 233 aminoácidos e 26kDa). Na forma biologicamente ativa, é um homotrímero (cujo peso molecular é 52 kDa), apresentando formato de cone triangular ou piramidal onde cada lado é formado por uma diferente subunidade monomérica. Os sítios de ligação aos receptores situam-se na metade inferior da

estrutura piramidal o que permite a ligação simultânea com mais de um receptor (NEDWIN et al., 1985; JONES, STUART e WALKER, 1989).

FIGURA 3 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO TNF- α



Fonte: <http://www.ntnu.no/~terjee/TNF.GIF>

PENNICA et al. (1984), após análise das seqüências de aminoácidos das citocinas TNF- α e LT- α , concluíram que as mesmas são estruturalmente relacionadas e apresentam 30% de identidade. Acredita-se que as regiões conservadas sejam responsáveis pelas atividades citotóxicas compartilhadas por TNF- α e LT- α , por meio da interação com um receptor comum expresso na superfície celular.

Dois receptores de membrana, denominados TNF-RI e TNF-RII foram identificados molecularmente (TARTAGLIA e GOEDDEL, 1992; GRELL et al., 1995) e são ativos na transdução de sinais e dependentes um do outro (VASSALLI, 1992; TARTAGLIA e GOEDDEL, 1992; GRELL et al., 1995). Os dois receptores podem reconhecer tanto TNF- α quanto LT- α (ANDREWS et al., 1990).

Durante mais de duas décadas, vários estudos tentaram demonstrar o mecanismo de expressão do *TNF*. Como muitas outras citocinas, a produção de TNF- α pode ser detectada após a ativação de vários tipos celulares (incluindo macrófagos e linfócitos T e B) por agentes mitogênicos (MAKHATADZA, 1998).

Entretanto, um aspecto distingue o TNF- α de outras citocinas: sua produção pode atingir altos níveis em resposta a um estímulo. Endotoxinas tal como LPS induzem uma resposta acentuada de TNF- α por macrófagos em um curto período de tempo, podendo levar ao choque letal (MAKHATADZA, 1998).

Em células T não-estimuladas, o processamento do pré RNAm do *TNF* é um processo ineficiente que resulta no acúmulo desse RNA no núcleo da célula. O processamento e excisão de todos os íntrons do pré RNAm do *TNF* é realizado rapidamente após a interação entre o receptor da célula T (TCR) e a estrutura peptídeo antigênico - moléculas HLA de classe II. Essa interação pode também intensificar outros níveis de regulação incluindo transcrição, estabilidade do RNA, tradução e eventos pós-traducionais, conduzindo a uma apurada expressão do *TNF*. Particularmente em células T, o $\text{TNF-}\alpha$ é a primeira citocina produzida após ativação, seguida por muitas outras (YANG et al., 1998).

A regulação pós-transcricional da expressão de *TNF* acontece através de seqüências UA, pela ligação de uma proteína reguladora de 38 kDa na região 3'UTR, controlando a reposição (*turnover*) do RNAm de *TNF*. LPS também intensifica o início da tradução e formação do complexo TNF-RNAm/ribossomo. Níveis aumentados de óxido nítrico endógeno, AMPc e prostaglandinas diminuem a produção de $\text{TNF-}\alpha$ (RINK e KIRCHNER, 1996).

BENDTZEN et al. (1988) analisaram células mononucleares provenientes de indivíduos HLA-DR2, que mostraram uma resposta significativamente mais baixa na produção de $\text{TNF-}\alpha$ quando estimuladas com LPS. WEBB e CHAPLIN (1990), concluíram que não existe evidência de que essa variação na expressão de *TNF* seja devida a uma variação no próprio gene, mas poderia ser devida ao efeito de um loco regulatório ligado à região de classe II do MHC.

Uma seqüência de 95 pares de bases a montante do início de transcrição é necessária para uma regulação positiva da expressão de *TNF* pela citocina GM-CSF e para regulação negativa de *TNF* pela IL-4 (MESSER et al., 1991).

Portanto, a regulação da expressão gênica de *TNF* é complexa e acontece principalmente em nível transcricional e de forma independente. A indução da expressão de *TNF* é regulada pelo sítio $\kappa 3$ do fator de transcrição $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (fator nuclear $\kappa 3$, envolvido na ativação de muitos genes da resposta imune) que liga também o ativador transcricional NFAT (fator nuclear de células T ativadas), resultando na indução de *TNF* (EIGLER et al., 1997). $\text{NF-}\kappa\text{B}$ exerce um papel central na transdução de sinais de ativação para o núcleo de leucócitos, em particular aqueles sinais que afetam a ativação transcricional de muitos genes que codificam citocinas (DROUET, SHAKOV e JONGENEEL, 1991).

3.1.4.3 Polimorfismo do gene *TNF*

O polimorfismo do *TNF* é relativamente reduzido (WEBB e CHAPLIN, 1990), assim como o de todos os genes que codificam as outras citocinas. Variações genéticas foram descritas na região onde se situa o gene *TNF*, dentre as quais, cinco microsátélites (a-e). O polimorfismo de microsátélites é caracterizado pelo número de repetições de dinucleotídeos. Referentes às seqüências (CT)_n existem: *TNFb* com 7 alelos, *TNFc* com 2 alelos, *TNFd* com 7 alelos e *TNFe*, que possui 3 alelos. O microsátélite *TNFd* foi associado com altos níveis de produção da proteína TNF- α (POCIOT et al., 1993; TURNER et al., 1995; ASANO et al., 1997). KHANI-HANJANIA et al. (2000) detectaram quatro novos microsátélites nessa região, em pacientes com artrite reumatóide e em indivíduos-controle, e foram designados a14 (122 pb), b8 (131 pb), b19 (132 pb) e d0 (122 pb). Essas variantes polimórficas refletem a heterogeneidade da região *TNF*, e podem ter implicações em associações com doenças e estudo de haplótipos.

Na região promotora do gene *TNF*, foram descritas, em populações européias, na posição -308, substituições de guanina (alelo *TNF**-308G ou *TNF**1) por adenina (alelo *TNF**-308A ou *TNF**2). Esse alelo, menos freqüente, tem sido associado com alta produção da citocina TNF- α . Taxas estáveis de produção interindividuais de TNF- α têm sido demonstradas bem como a associação com alelos HLA-DR. Combinações alélicas de genes *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DR* e *-DQ* e outros genes do MHC, ocorrem mais freqüentemente do que se esperaria, quando se comparam suas freqüências individuais, constituindo os assim chamados haplótipos extensos. O alelo *TNF**-308A ou *TNF**2 está associado ao haplótipo HLA-A1, -B8 e -DR3. Observou-se que indivíduos HLA-DR2 produzem menos TNF- α , enquanto aqueles que são HLA-DR3 e -DR4, produzem maior quantidade dessa citocina, o que está relacionado ao alelo *TNF**-308A (WILSON et al., 1993).

Foi demonstrada associação do polimorfismo -308, localizado na região promotora do gene *TNF*, com aumento no risco de ruptura prematura de membranas fetais das pacientes. O alelo *TNF**-308A estava presente em 44% (n=24/55) das pacientes e em 30% dos controles (n=33/110) (ROBERTS et al.,

1999).

PIETROWSKI et al. (2004), na Áustria, analisaram dois polimorfismos do gene *TNF* (-308 G>A e -863 C>A) em 168 mulheres caucasóides com RSA e 212 mulheres-controle e não encontraram associação entre esses polimorfismos e o RSA.

3.1.5 A Citocina Interferon- γ e o Gene *IFNG*

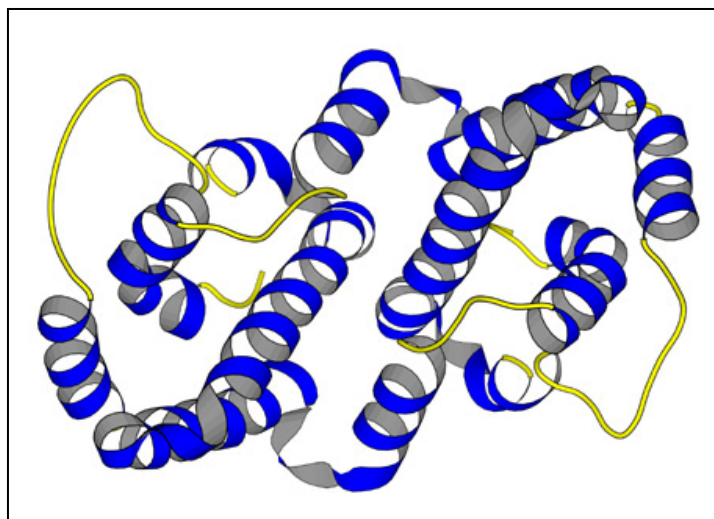
Em 1965, WHEELLOCK relatou que a fito-hemaglutinina poderia induzir, a partir de leucócitos, a síntese de um inibidor viral semelhante ao interferon- α . Essa substância foi denominada interferon- γ (IFN- γ).

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória e imunoreguladora que atua virtualmente sobre todos os componentes da resposta imune. Seu campo de ação inclui a estimulação ou inibição das funções celulares constitutivas, a indução de novas funções efectoras, propriedades proliferativa e antiproliferativa, e alterações em produtos celulares secretados e associados às membranas. O efeito regulador é dependente de dose, do tempo de exposição, e da presença ou ausência de outros mediadores inflamatórios (WILLIAMS, JURKOVICH e MAIER, 1993).

3.1.5.1 O gene *IFNG*: organização gênica, produtos moleculares, receptores e regulação gênica

O IFN- γ (Figura 4), também conhecido como interferon-imune, é codificado por um gene de cópia única, *IFNG*, localizado no cromossomo 12 em 12q24.1 (TRENT, OLSON e LAWN, 1982). A estrutura do gene *IFNG* é altamente conservada, sendo constituída por 4 éxons e 3 íntrons (GRAY e GOEDEL, 1982). Essa estrutura foi observada em todas as espécies analisadas, e a análise da sequência de DNA tem mostrado maior identidade na região promotora do DNA do que na região codificadora da proteína. O DNAc e/ou o DNA genômico foi clonado de muitas espécies, inclusive a humana (DERYNCK et al., 1982; DEVOS et al., 1982). A proteína humana é constituída por 166 aminoácidos, dos quais 23 representam uma sequência sinal hidrofóbica (RINDERKNECHT, O'CONNOR e RODRIGUEZ, 1984).

FIGURA 4 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO IFN- γ



Fonte: http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2004/warwick_robinson/interdim.jpg

O gene que codifica o receptor do IFN- γ está localizado no cromossomo 6 (RASHIDBAIGI et al., 1986) e codifica para uma cadeia polipeptídica que participa da ligação do receptor. Uma segunda cadeia é necessária para a transdução do sinal e, provavelmente, proteínas adicionais são necessárias para certas atividades do IFN- γ (SOH et al., 1994; HEMMI et al., 1994). A ligação do IFN- γ ao receptor, seguida de ativação gênica, depende de tirosinas-quinase (WATLING et al., 1993; MULLER et al., 1993; SHUAI et al., 1993).

A regulação da expressão do gene *IFNG* parece ser complexa, a análise da estrutura genômica revela elementos no promotor do gene e em íntrons que podem atuar na regulação gênica (CICCARONE et al., 1990; BROWN et al., 1991; YE et al., 1994). Esses elementos podem ser induzidos por substâncias como fito-hemaglutinina/acetato miristato forbol (PHA/PMA), PMA/ionomicina, concavalina A, proteína tax do HTLV-1, e estrogênio ou inibidos pela ciclosporina A (BROWN, 1992; PENIX et al., 1993) ou glicocorticóides (CIPPITELLI et al., 1995). O promotor e as regiões intrônicas provavelmente interagem na sinalização extracelular, resultando na ativação da transcrição do *IFNG* entre meia a duas horas após o evento de sinalização inicial. O IFN- γ , tanto *in vitro* quanto *in vivo* aumenta a expressão do próprio RNAm do *IFNG* em humanos (HARDY e SAWADA, 1989) e murinos (COCKFIELD et al., 1993). A metilação é

um fenômeno importante de inibição da expressão gênica. Com relação ao *IFNG*, em células nas quais o promotor está metilado, a produção de IFN- γ não é observada, enquanto em células nas quais o promotor está hipometilado ou não-metilado, o IFN- γ é produzido (YOUNG et al., 1994). Em células T humanas, a completa metilação do promotor do *IFNG* e do primeiro íntron foi observada em timócitos, células T neonatais, e células T adultas não-estimuladas, e substancial hipometilação foi observada em células T CD8+ e CD4+ efetoras (MELVIN et al., 1995). A estabilidade do RNAm do *IFNG* pode ser importante no controle da expressão gênica, e, de fato, a sinergia observada entre IL-2 e IL-12 na indução da expressão do *IFNG* pode ser atribuída, em grande parte, a um aumento da meia vida do RNAm (CHAN et al., 1992). Os níveis do RNAm do *IFNG* geralmente atingem o pico com 4 a 8 horas após indução e, posteriormente, decrescem rapidamente. Esse rápido decréscimo é devido provavelmente a seqüências repetitivas AUAA na região não-traduzida do DNAC. Essas seqüências, presentes em DNAC de muitos genes de citocinas, contribuem substancialmente para a rápida degradação do RNAm (SHAW e KAMEN, 1986). Embora o controle da expressão do *IFNG* ocorra em muitos níveis, cada um deles depende da interação localizada das células produtoras com células efetoras e/ou seus produtos (YOUNG e HARDY, 1995).

3.1.5.2 Biossíntese e papel biológico da citocina IFN- γ

O IFN- γ é produzido em larga escala principalmente por células T e LGL (*Large Granular Lymphocytes* = Linfócitos Grandes Granulares) (KASAHARA et al., 1983 a, b; YOUNG e ORTALDO, 1987), cuja produção pode ser significativamente aumentada pelo tratamento com IL-12 (WU et al., 1993). Nas células T CD4+, o principal estímulo fisiológico para a produção de IFN- γ é o antígeno no contexto de moléculas MHC de classe II. Similarmente, as células T CD8+, produzem IFN- γ , quando o antígeno está presente no contexto de moléculas MHC de classe I (YOUNG e HARDY, 1995). Muitos outros estímulos podem induzir a síntese e, ao nível de LGL, os dois principais indutores são a IL-2, sintetizada por células T (KASAHARA et al., 1983a) e a IL-12 (KOBAYASHI et al., 1989). Essas citocinas podem atuar independentemente e sinergisticamente

para estimular a produção de IFN- γ , tanto em LGL, quanto em células T (CHAN et al., 1991).

O IFN- γ também pode ser produzido por outros tipos de células, incluindo linhagens de células B (BENJAMIN et al., 1986; PANG et al., 1992), macrófagos e suas linhagens celulares (FULTZ et al., 1993; DiMARZIO et al., 1994), células mielomonocíticas (ANDO et al., 1988), e células tumorais de origem não-linfóide (NITTA et al., 1994).

O IFN- γ atua de diversas maneiras sobre as células B: por exemplo, inibindo a proliferação celular induzida por LPS (ABED, CHACE e COWDERY, 1994; JURADO et al., 1989) e a indução de moléculas de classe II do MHC (MOND et al., 1986), suprimindo a produção de IgG1 em camundongos e IgE, e aumentando a síntese de IgA2 (SNAPPER, PESCHEL e PAUL, 1988).

O IFN- γ tem efeito bifuncional sobre as células genitoras hematopoéticas, em geral um efeito supressivo, quando atuando isoladamente (MEANS et al., 1994). No entanto, atuando sinergisticamente com outras citocinas, incluindo a IL-3, estimula o desenvolvimento das células hematopoéticas (MUROHASHI e HOANG, 1991, SHIOHARA, KOIKE e NAKATA, 1993; SHIOHARA et al., 1994).

O IFN- γ é o principal fator de ativação de macrófagos (SCHULTZ e KLEINSCHMIDT, 1983), nos quais ativa numerosas funções, incluindo a citotoxicidade a tumores (PACE et al., 1983), e a atividade antimicrobiana (NATHAN et al., 1983), também têm potencial microbicida contra patógenos intracelulares (TORRICO et al., 1991), e estimula a apresentação de antígenos aos linfócitos através da indução de moléculas de classe II do MHC (BASHAM e MERIGAN, 1983).

Em suma, o IFN- γ é crítico para subsequente estimulação ou ativação da expressão gênica, diferenciação e função de monócitos/ macrófagos (PERUSSIA et al., 1983 a,b; UCLA et al. 1990). Esses efeitos, juntamente com a importância de monócitos/macrófagos como fontes de IL-12 (potente indutor de IFN- γ), demonstram o papel crítico que a população de linfócitos tem na regulação da resposta imune (YOUNG e HARDY, 1995).

IFN- γ pode ter efeitos antagônicos sobre populações específicas de células T. O IFN- γ suprime eficazmente o crescimento de células Th2, produtoras de IL-4

(GAJEWSKI e FITCH, 1988 a, b), mas, juntamente com a IL-12, pode atuar como um fator de crescimento autócrino para células Th1 (PAUL e SEDER, 1994).

O principal papel do IFN- γ sobre os neutrófilos polimorfonucleares ocorre através da indução da expressão de receptores de alta afinidade para IgG, resultando em potencialização da fagocitose e citotoxicidade (PERUSSIA et al., 1987; PETRONI, SHEN e GUYRE, 1988).

O IFN- γ pode aumentar a expressão de CD62L (L-selectina), em eosinófilos (MOMOSE et al., 1999) e de moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) em fibroblastos pulmonares, facilitando a migração de células inflamatórias (SPOELSTRA et al., 1999).

3.1.5.3 Polimorfismo do gene *IFNG*

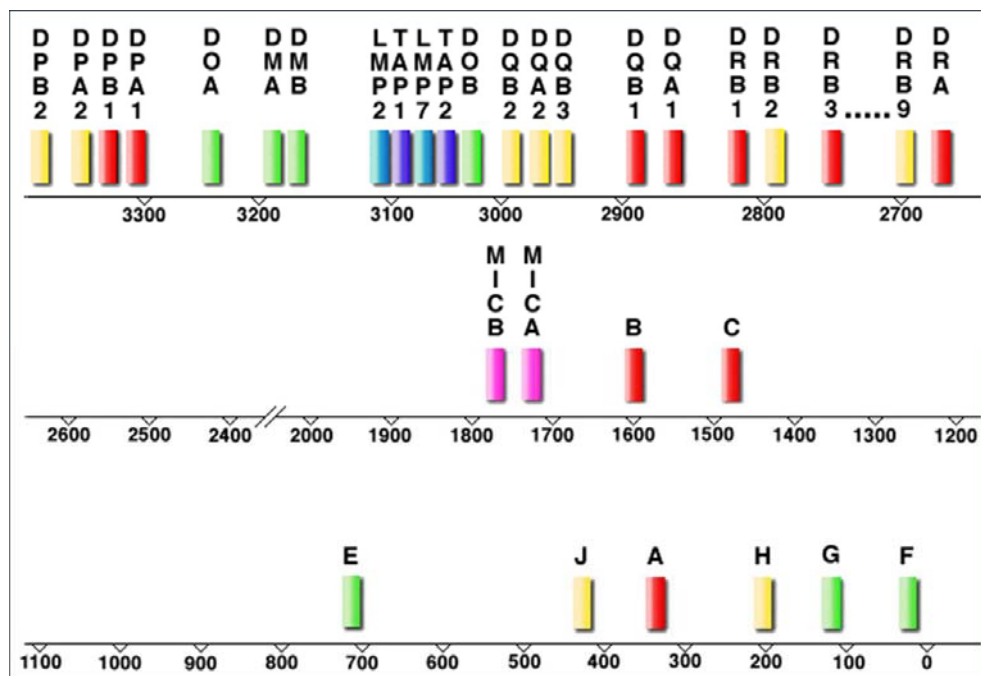
O gene humano que codifica o IFN- γ tem no primeiro íntron um STR (*Short Tandem Repeat* = Curtas Repetições em *Tandem*) de CA, caracterizando diferentes alelos: *IFNG**1 com 12 repetições CA, *IFNG**2 (13 CA), *IFNG**3 (14 CA), *IFNG**4 (15 CA). O polimorfismo desse microsatélite está associado com variação individual na produção de níveis de IFN- γ (PERREY et al., 1999). Indivíduos homozigotos para *IFNG**2 apresentaram produção significativamente aumentada de IFN- γ ($p=0,01$) quando comparada com indivíduos com as outras combinações alélicas (PRAVICA et al., 1999).

PRAVICA et al. (2000) descreveram um polimorfismo bialélico (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*), T>A, na posição +874, no mesmo íntron onde se situam os microsatélites acima relacionados. Observou-se uma correlação absoluta entre o alelo *IFNG**+874(T) e o alelo *IFNG**2 caracterizado por 13 repetições CA. Indivíduos +/+, +/- e -/- para o alelo *IFNG**2, foram seqüenciados, respectivamente, como TT, TA e AA com relação aos alelos *IFNG**+874 T>A. O polimorfismo na posição +874 coincide com o suposto sítio de ligação do fator de transcrição NF-kB, e poderia ser, em parte, responsável pela associação prévia encontrada entre o polimorfismo de microsatélite CA e a produção de IFN- γ .

3.1.6 Abortamento Espontâneo Recorrente e MHC com Ênfase em *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1*

No Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), constituído por aproximadamente 4000 kilobases (kb) e situado no braço curto do cromossomo 6 (Figura 5) na região 6p21.3, encontram-se os genes que codificam as moléculas de Classe II do MHC (LAMM et al., 1974; LAMM e OLAISEN, 1985).

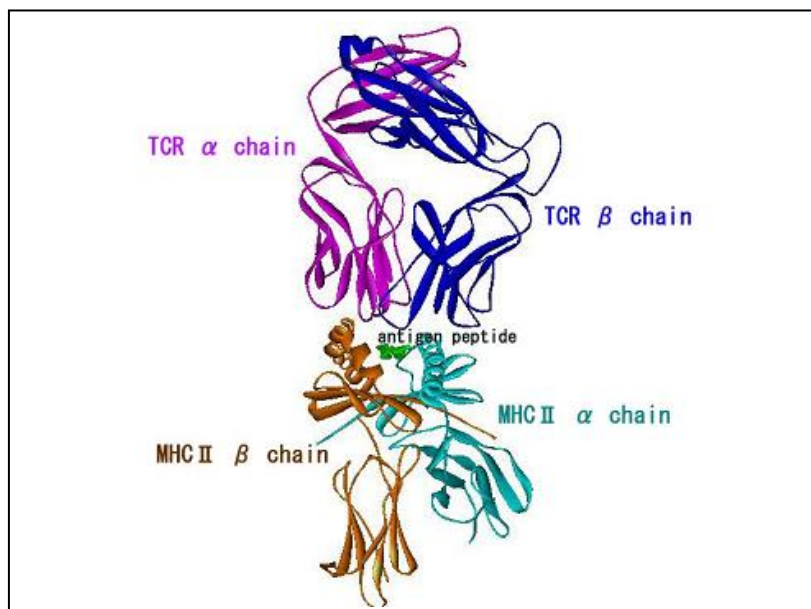
FIGURA 5 - MAPA ESQUEMÁTICO DO MHC



Fonte: <http://www.anthonynolan.org.uk/>.

Moléculas MHC de classe II são proteínas heterodiméricas α/β presentes na superfície celular que apresentam antígenos processados às células Th, através da interação MHC-TCR (Figura 6).

FIGURA 6 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO MHC E DO TCR



Fonte: http://www.pd-fams.com/ja/product/KS/JPGs/20040611/TCR_MHC2_TSST_0.jpg

As moléculas HLA-DQ são formadas pelas cadeias $DQ\alpha$ e $DQ\beta$ que são codificadas pelos genes *HLA-DQA1* e *HLA-DQB1* presentes no mesmo cromossomo (em cis) ou em cromossomos diferentes (em trans). De forma similar, as moléculas HLA-DR são formadas pelas cadeias $DR\alpha$ e $DR\beta$ codificadas pelos genes *HLA-DRA1* e *HLA-DRB1* presentes no mesmo cromossomo (em cis) ou em cromossomos diferentes (em trans) .

Os loci que codificam cadeias β das moléculas de classe II do MHC são extremamente polimórficos. Tal polimorfismo ocorre com maior frequência em regiões hipervariáveis (HVRs) do domínio $\beta 1$ (BELL et al., 1987).

A possível associação entre antígenos HLA e RSA tem sido investigada sob dois aspectos: o primeiro, envolvendo o compartilhamento de antígenos HLA em casais (OKSENBERG et al., 1984; JOHNSON et al., 1985; MCINTYRE et al., 1986; COULAM, MOORE e O'FALLAN, 1987; CAUCHI et al., 1988; CHRISTIANSEN et al., 1989; STECK et al., 1995; WAGENKNECHT, GREEN e MCINTYRE , 1997), e o outro aspecto se refere à distribuição de antígenos HLA em mulheres com RSA, quando comparadas com controles normais. Há

evidências de que os antígenos HLA, que se expressam na superfície de tecidos fetais ou placentários, possivelmente induzem a resposta aloimune da mãe, considerada benéfica ao processo implantacional. Mulheres com RSA, principalmente de etiologia desconhecida, podem apresentar alteração da resposta imune que induz reação alogênica contra o feto (GILL, 1983). Determinadas associações com alelos HLA podem levar à hiporesponsividade a produtos fetais MHC-paterno-derivados, embora numerosos estudos tenham levado a resultados conflitantes.

Estudos envolvendo antígenos HLA e RSA têm recebido crescente atenção. Através de métodos sorológicos, TAKAMIZAWA et al. (1987) encontraram uma frequência aumentada de antígenos HLA-DR1 e -DR8 em mulheres japonesas com RSA, mas sem significado estatístico. Posteriormente SASAKI et al. (1997) usando o método PCR-SSP, observaram aumento significativo na frequência de HLA-DR4 em mulheres japonesas com RSA.

CHRISTIANSEN et al. (1994, 1996, 1999) relataram que marcadores genéticos maternos HLA-DR1, -DR3 e -DR10 poderiam estar envolvidos no abortamento espontâneo em população dinamarquesa. Posteriormente, a associação de *HLA-DRB1*03* com RSA foi confirmada em um trabalho envolvendo 588 pacientes e 562 controles, mas havia pacientes que apresentavam anticorpos antifosfolídeos (KRUSE et al., 2004).

No Japão, TAKAKUWA et al. (2003), através da técnica PCR-RFLP, analisaram 79 mulheres com abortamento primário comparadas com 115 mulheres férteis normais e constataram a frequência aumentada do alelo *HLA-DRB1*1502* em pacientes com relação a controles, mas a diferença não foi significativa após correção.

Na China, Wang et al. (2004), analisaram 32 pacientes com RSA, e 54 mulheres-controle que tiveram pelo menos uma gravidez a termo e os resultados mostraram que a frequência dos alelos *DQB1*0604/*0605* em pacientes com RSA estava significativamente aumentada nas pacientes ($p=0,0128$ e Risco Relativo = 5), enquanto a frequência dos alelos *HLA-DQB1*0501/0502* estava significativamente diminuída entre as pacientes ($p=0,0426$ e Risco Relativo= 0,26) com relação às mulheres-controle.

3.1.7 O Paradigma Th1/Th2

Um dos avanços mais significativos na compreensão dos fenômenos envolvidos na resposta imune foi a elaboração do paradigma Th1/Th2, que fornece uma variedade de conhecimentos para se compreender como o sistema imune responde aos diferentes tipos de patógenos e estímulos.

A maioria das respostas imunes envolve principalmente respostas do tipo humoral ou mediadas por células, e há evidências de que essas duas respostas não são freqüentemente mutuamente exclusivas (PARISH, 1972; KATSURA, 1977). A descoberta de dois subtipos de clones de células T auxiliares (Th) CD4+, Th1 e Th2, derivadas de um terceiro fenótipo, Th0, em camundongos e em humanos, fornece algumas explicações para a expressão recíproca das duas respostas (MOSMANN et al., 1986; DEL PRETE et al., 1991).

Quando ativadas por antígenos/células apresentadoras de antígenos, as células Th1 produzem IL-2, IFN- γ e LT- α (MOSMANN et al., 1986; CHERWINSKI et al. 1987; COFFMAN et al., 1988; MOSMANN e COFFMAN, 1989 a, b). O padrão de citocinas Th1 está freqüentemente associado com resposta mediada por células, particularmente apropriadas para destruir intracelularmente patógenos extracelulares endocitados por células fagocíticas ou patógenos que se multiplicam no citoplasma das células infectadas, estando, também, associado à hipersensibilidade do tipo tardia e ativação das células TCD8+, e pela produção de anticorpos opsonizantes, podendo estar associado com estímulo inflamatório e dano tissular (MOSMANN et al., 1989b). Em contraste, o padrão de citocinas Th2, que inclui IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, inibe as respostas mediadas por células fagocíticas, mas estimula respostas de anticorpos, promovendo a produção de quantidades relativamente elevadas de IgM, IgE, e isotipos de IgG não-ativadores do complemento, além de estimular a ativação e diferenciação de eosinófilos e atua nas reações alérgicas (CHERWINSKI et al., 1987; BROWN et al., 1989).

A secreção das diferentes citocinas contribui de forma eficaz para a diferenciação entre os subtipos de células T. Assim, a regulação das respostas humoral e mediada por células pode ser explicada, em parte, pela regulação cruzada da diferenciação e ativação das células Th1 e Th2 no decorrer de uma

resposta imune. Algumas dessas respostas reguladoras são conhecidas, como por exemplo, o IFN- γ , que é produzido pelas células Th1 e inibe a proliferação de clones Th2 (GAJEWSKI e FITCH, 1988 a , b; FERNANDEZ-BOTRAN et al., 1988), enquanto a IL-4, que é produzida pelas células Th2, inibe a diferenciação e proliferação de células Th1 (Le GROS et al., 1990; SWAIN et al., 1990).

Um terceiro tipo de célula T foi identificado, as chamadas células Th3 CD4+ que secretam TGF- β mas não secretam IL-2, IFN- γ , IL-4 ou IL-10, e parecem ser o único subtipo de célula T que age nas mucosas, atuando na regulação negativa de células Th1 e de outras células do sistema imune (MOSMANN e SAD, 1996; RAGHUPATHY, 2001).

3.1.8 Citocinas na Gravidez

O mecanismo pelo qual o sistema imune materno não rejeita o feto durante a gravidez a despeito da presença de antígenos paternos é desconhecido. Evidências indicam uma interação bidirecional entre o sistema imune materno e o sistema reprodutivo durante a gravidez, o que resultaria no estímulo ou inibição do desenvolvimento da unidade fetoplacentária (WEGMANN, 1993).

Citocinas são abundantes no útero grávido. Qualquer distúrbio no delicado balanço imunológico que ocorre na interface materno-fetal poderia resultar em perda ou outras complicações gestacionais (ROBERTSON et al., 1994; FRIED et al., 1998; RIVERA et al., 1998).

A hipótese do imunotrofismo placentário (WEGMANN, 1984; 1988) orienta muitos dos estudos que relacionam citocinas e gestação. Nesse contexto, as citocinas são consideradas elementos fundamentais nos eventos de comunicação celular na interface materno-fetal, remodelando o ambiente uterino para que aceite um embrião semi-alogênico. Durante a gestação, estão presentes no endométrio uterino, linfócitos e macrófagos maternos potencialmente capazes de mediar uma resposta imune celular e destruir o embrião. Os estudos de Wegmann, iniciados na década de 70, sugeriam que produtos de macrófagos e linfócitos T ativados atuavam como fatores de crescimento para células placentárias, sem causar dano ao embrião, mas promovendo seu crescimento e viabilidade. Células T maternas, reconhecendo aloantígenos fetais presentes na

interface materno-fetal, responderiam, secretando citocinas, que desencadeariam uma “inflamação ontogênica” que promoveria o crescimento do trofoblasto, um melhor desempenho das funções placentárias e, conseqüentemente, uma gestação normal. Wegmann argumentava que essa idéia não era sem precedentes uma vez que a participação de células T e citocinas em fenômenos tais como hematopoese, regeneração hepática e, em uma variedade de outros fenômenos de crescimento, era bem conhecida (GREEN e WEGMANN, 1986).

WEGMANN (1993) ampliou sua hipótese argumentando que o conceito se protegeria secretando citocinas que regulariam a expressão daquelas citocinas prejudiciais à gestação (IL-2, INF- γ , e LT- α , referida em sua publicação como TNF- β). Dessa forma, eram muitas as evidências da existência de uma rede de interações bidirecionais entre o sistema imune materno e a unidade feto-placentária. Isso foi posteriormente confirmado por GARCIA-LLORET et al. (1994) que demonstraram interações funcionais entre a placenta e certas citocinas, principalmente no que se refere à diferenciação do citotrofoblasto e à secreção de hormônios. Nesse trabalho, os autores investigaram a atuação de citocinas linfohematopoéticas: CSF-1 (Fator Estimulador de Colônias) e GM-CSF (Fator Estimulador de Granulócitos e Macrófagos), no desenvolvimento placentário de mamíferos e na diferenciação funcional e morfológica do trofoblasto humano *in vitro*. A produção dessas citocinas estava sob o controle da IL-1 e do TNF- α , ambos com funções similares e produzidos pelo trofoblasto. Ficou evidente que, além das citocinas com efeitos deletérios, havia outras que favoreciam a sobrevivência do conceito (WEGMANN et al., 1993; GARCIA-LLORET et al., 1994).

Alguns estudos forneceram subsídios para essas observações, como a demonstração de que (1) o tamanho médio da prole e o peso médio da placenta são maiores em gravidez alogênica do que em gravidez singênica, (2) o tamanho da prole é maior em gravidez múltipara do que em primípara, e (3) tamanho da prole e peso da placenta são maiores em fêmeas murinas grávidas pré-imunizadas com linfócitos de linhagem paterna (BEER, SCOTT e BILLINGHAM, 1975; BEER e BILLINGHAM, 1977). Tais evidências somadas à idéia de que a resposta imune materna pode promover a sobrevivência fetal fortalece a Hipótese do Imunotrofismo, que vislumbra papel importante para a reatividade imune

materna, mediada primariamente por células T maternas, macrófagos e citocinas. ATHANASSAKIS et al., (1987) e WEGMANN (1988) postularam que esses mecanismos efetores da reatividade imune podem promover a sobrevivência fetal assim como o aumento do peso da placenta e sua função. Essa hipótese foi testada em murinos (LIN et al., 1993; CHAOUAT et al., 1995; KRISHNAN et al., 1996a, b; ARCK et al., 1999) e em humanos (SZONYI et al., 1999; GOODWIN et al., 1998; SAITO et al., 1999; CHOI et al., 2000).

Citocinas pró-inflamatórias tais como IFN- γ , TNF- α , e citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, foram investigadas como potenciais reguladoras desse equilíbrio que se estabelece entre mãe e embrião (PICCOTTI et al., 1997; FRIED et al., 1998; DARMOCHWAL-KOLARZ, 1999; BROWN et al., 2000; PICCINNI et al., 2000). Durante a gestação, deveria ocorrer um equilíbrio entre os dois tipos de citocinas, o qual poderia estar alterado favorecendo ou prejudicando o desenvolvimento embrionário (GARCIA-LLORET et al., 1994).

Os primeiros estudos que mostraram a resposta imune anormal, no contexto do paradigma Th1/Th2, demonstraram, *in vitro*, que antígenos do trofoblasto induzem a produção de citocinas embriotóxicas como IFN- γ e LT- α pelos linfócitos de mulheres suscetíveis a RSA (HILL, 1991; YAMADA, POLGAR e HILL, 1994; HILL, POLGAR e ANDERSON, 1995). Células mononucleares do sangue periférico de uma proporção significativa de mulheres com história de RSA, quando estimuladas *in vitro* com extratos de antígenos de trofoblasto, mostraram um aumento de proliferação celular e produziram fatores solúveis que eram tóxicos para embriões murinos e linhagens celulares trofoblásticas (YAMADA, POLGAR e HILL, 1994; HILL, POLGAR e ANDERSON, 1995). JENKINS et al. (2000), utilizando o método de ELISA, analisaram o soro de mulheres grávidas e concluíram que o sucesso gestacional estava associado com níveis aumentados de IL-10, enquanto o aborto estava associado com níveis aumentados de IFN- γ . Isso sugere que a imunidade tipo Th2 pode ser uma resposta natural a antígenos do trofoblasto, enquanto respostas Th1 são aberrantes e associadas com RSA inexplicáveis, e podem, portanto, ter importante papel na falência reprodutiva. Além disso, pode-se supor que o defeito primário nessas mulheres com RSA inexplicável pode ser a incapacidade para montar uma resposta Th2 dirigida aos antígenos placentários, reação que,

normalmente, regula negativamente respostas prejudiciais Th1. Mulheres com RSA podem ter um componente anormal relacionado com a regulação da resposta imune no que se refere ao balanço Th1/Th2 que orienta a produção de citocinas (HILL, POLGAR e ANDERSON, 1995).

No estudo de MOREAU et al. (1999), os autores concluíram que a IL-10 induz seletivamente a expressão de HLA-G em trofoblasto e monócitos, influenciando o padrão de expressão das moléculas HLA de classe I na interface materno-fetal e protegendo o embrião da rejeição.

Enquanto certas citocinas são benéficas para o sucesso da gravidez, foi proposto que a deficiência nessas citocinas poderia levar à placentação deficiente, crescimento subnormal e possivelmente ainda à morte fetal (CLARK e CHAOUAT, 1989). A partir dessas observações, HILL (1991) propôs que os eventos reprodutivos normais podem ser afetados adversamente por fatores imunológicos e denominou-os de imunodistrofismo.

TNF- α é ativamente produzido por células do epitélio uterino e células do trofoblasto placentário. Modulando o crescimento, a diferenciação celular e a síntese de várias substâncias, admite-se que o TNF- α influencie a embriogênese humana, controlando o crescimento e a diferenciação do trofoblasto e limitando a invasão uterina pelo sinciciotrofoblasto. TNF- α biologicamente ativo foi encontrado no fluido amniótico, no soro materno e nas secreções vaginais. Alguns experimentos demonstraram a presença de receptores para TNF- α na placenta. No entanto, seu possível papel no desenvolvimento embrionário não foi ainda elucidado (HUNT e ORR, 1992; KRUSE et al., 2000).

Altos níveis de TNF- α sérico e no fluido amniótico foram observados em certos distúrbios gestacionais tais como parto prematuro e retardo do crescimento fetal, uma evidência de que possa ser mediador importante do abortamento recorrente atribuído a causas imunológicas (DAHER et al., 1999; HILL e CHOI, 2000).

Bastante significativo é o fato de citocinas inflamatórias, tais como IL-2, TNF- α e IFN- γ interromperem uma gravidez normal, quando injetadas em fêmeas de camundongos grávidas (CHAOUAT et al., 1990).

Certas citocinas deletérias podem apresentar efeitos adversos no conceito, ou por atividade embriotóxica direta ou danificando o trofoblasto placentário (CLARK e CHAOUAT, 1989; HILL, 1991; DENEYS e DeBRUYERE,

1997; MOHAPELOA et al., 1998; HILL e CHOI, 2000). O IFN- γ inibe o desenvolvimento do trofoblasto *in vitro*, e quando o IFN- γ é associado com o TNF- α ocorre a inibição do desenvolvimento embrionário e fetal, e também da proliferação *in vitro* de linhagens trofoblásticas humanas (HAIMOVICI, HILL e ANDERSON, 1991). O IFN- γ em combinação com o TNF- α é citotóxico para células embrionárias semelhantes a fibroblastos em roedores (SUFFYS et al., 1989) sendo que esse último é o mediador da apoptose de células trofoblásticas (YUI et al., 1994). O IFN- γ atua também inibindo a secreção de GM-CSF no epitélio uterino e, devido ao fato do GM-CSF promover o crescimento e/ou diferenciação do trofoblasto, a falta dessa citocina pode ser deletéria para o mesmo (ROBERTSON et al., 1994).

As células NK e os linfócitos TCD8+, quando estimulados por TNF- α e IL-2, originam células LAK (células exterminadoras ativadas por linfocinas) que se mostraram capazes de matar células trofoblásticas (DRAKE e HEAD, 1989). Quando injetadas em murinos, as células NK levam à reabsorção fetal e tal fato pode ser revertido com anticorpos anti-NK (KINSKY et al., 1990). Em humanos, os níveis de células NK no sangue periférico de mulheres não-grávidas com história de RSA é mais elevado quando comparado com mulheres não-grávidas sem história de RSA (KWAK et al., 1995).

A concentração de citocinas do tipo Th1 juntamente com as citocinas Th2 também pode ser crítica em certas fases da gravidez. As citocinas são altamente pleiotrópicas e multipotentes, pois uma mesma citocina pode mediar efeitos diferentes em diferentes concentrações e em diferentes períodos da gestação. Por exemplo, o CSF-1 e o GM-CSF têm papel no crescimento e nutrição do trofoblasto, mas, um excesso dessas citocinas, pode levar ao abortamento no início da gravidez (LEA e CLARK, 1993). Algumas citocinas tipo Th1, como o TNF- α , podem ter papel importante no período peri-implantação e o estabelecimento da gravidez, mediando a comunicação entre células do embrião e células uterinas maternas (TARTAKOVSKY e BEN-YAIR, 1991; HAIMOVICI e ANDERSON, 1993; CHARD, 1995).

3.1.9 Manutenção de um Desvio Th2 na Gravidez Normal

A principal resposta imune humoral induzida pela gravidez em murinos envolve a subclasse IgG1 não-fixadora do complemento. Esse é um anticorpo não-citotóxico com propriedades protetoras em potencial. Esse desvio da resposta imune está relacionado ao desvio da resposta imune Th1 para Th2 (BELL e BILLINGTON, 1980).

Citocinas do tipo Th2, IL-4 e IL-6 induzem a produção de HCG pelo trofoblasto, e o HCG estimula a produção de progesterona pelo corpo lúteo na gravidez. A progesterona estimula a secreção de citocinas Th2 e inibe a secreção de citocinas Th1 (PICCINNI et al., 1995; SAITO, 2000).

Em murinos, a proteção contra a reabsorção fetal pela aloimunização é acompanhada por um aumento na produção de IL-10 na placenta. O sobrenadante da decídua tem atividade supressora que foi relacionada ao TGF β -2 (Fator β -2 transformante do crescimento), cuja expressão está reduzida ou ausente em murinos sujeitos à reabsorção fetal e em certas mulheres com RSA (LEA et al., 1995).

Teoricamente, a mudança do padrão Th2 para Th1 em uma proporção de mulheres grávidas pode ser atribuída a um ou mais fatores. Deficiências em uma ou mais das supostas moléculas imunomodulatórias, citadas anteriormente, podem afetar esse desvio. E ainda, enquanto células B, macrófagos e células dendríticas podem geralmente apresentar antígenos de tal modo a iniciar tanto resposta Th1 como Th2, a preponderância de certas citocinas no local da ativação das células T pode levar à mudança em uma ou outra direção (MOSMANN e SAD, 1996). Um balanço entre IL-12 (favorece a resposta Th1) e IL-4 (favorece a resposta Th2) determina a eventual consequência da dicotomia Th1/Th2 durante uma resposta imune (TRINCHIERI, 1993, 1994).

Assim, as citocinas do tipo Th2 provavelmente contribuem para a manutenção da gravidez, controlando os sistemas imune e endócrino e promovendo a função do trofoblasto no local da implantação (SAITO, 2000). Como os níveis de citocinas são controlados geneticamente, tal controle pode ter um papel importante no curso de uma resposta imune durante o processo reprodutivo (POCIOT et al., 1993).

3.1.10 Contestação do Paradigma Th1/Th2

Novas descobertas sobre a função das citocinas não correspondem à dicotomia clássica do equilíbrio Th1/Th2. Além da capacidade de ativar e regular as células NK, pela ação sobre moléculas de adesão e pelos efeitos regulatórios no processo de vascularização, elas são de grande interesse nas relações materno-fetais (CHAOUAT et al., 2002, 2005).

Alguns autores vêem a relação materno-fetal como semelhante a uma relação entre hospedeiro/tumor ou hospedeiro/parasita e não como uma relação entre hospedeiro e enxerto (LOKE e KING, 1995). CHAOUAT et al. (2002), tendem a acreditar que essas classificações são fúteis, que a relação materno-fetal é única e representa passo a passo uma interação simbiótica. E, ainda, quando o paradigma do equilíbrio Th1/Th2 foi descrito, a maioria das atenções estava voltada para os linfócitos T clássicos. As pesquisas apontam até agora para um possível papel das células NK (GUIMOND et al., 1997; CHAOUAT et al., 1998), células $T\gamma\delta$ (ARCK et al., 1997), para a importância das moléculas de adesão (APLIN, 1996) e das moléculas inflamatórias na implantação (Mac MASTER et al., 1992; SANFORD et al., 1992; SIMON et al., 1994; LOKE e KING, 1995), fugindo do conceito de "tolerância" ou do fato do sistema imune materno não responder ao conceito.

Inicialmente, às células NK era conferido somente o potencial de invadir o tecido fetal. Acreditava-se que sua ativação resultaria na destruição da unidade feto-placentária. E, ainda, em murinos, o papel das células NK foi relacionado tanto à proteção como à indução de reabsorção fetal, mas também se mostrou dependente da produção local de IL-10 (BAINES e De FOUGEROLLES, 1988; GENDRON e BAINES, 1988; KINSKY et al., 1990). Surpreendentemente, a produção de IL-10 pelo trofoblasto mostrou ser controlada pelas células NK, demonstrando pela primeira vez um duplo envolvimento dessas células (CHAOUAT et al., 1998).

A descoberta de que a placenta murina, deficiente de células NK, é geralmente hipotrófica, conduzindo a uma morte fetal prematura, redirecionou o balanço Th1/Th2 das células T para as células NK (GUIMOND et al., 1997, 1998). Esses dados mostraram que a produção de citocinas imunotróficas pode estar, de

fato, sendo controlada pelas células NK; portanto, o alorreconhecimento na gestação é exercido pelas células NK mais precisamente do que pelos linfócitos T, o que pode ocorrer provavelmente em humanos também (CHAOUAT, 2002).

A primeira indicação de que o paradigma "Uma gestação normal é um fenômeno Th2" poderia não ser universalmente aplicável veio com a descoberta do envolvimento de um meio de implantação semelhante ao padrão pró-inflamatório (WEGMANN et al., 1993). Os efeitos de tal resposta inflamatória local foram agora relacionados à expressão de moléculas de adesão no trofoblasto placentário e nas células da decídua uterina, as quais são necessárias para que a implantação ocorra. Esse papel inflamatório na implantação indica que a gestação não representa somente uma resposta do tipo Th2, e aponta a existência de várias "janelas" que selecionam o perfil de citocinas, sendo a janela da implantação uma delas. A relação materno-fetal não pode ser considerada como simples tolerância a um tecido estranho, mas sim como uma série intrincada de interações mútuas entre as citocinas, orquestrando uma regulação seletiva no sistema imune e também controlando a adesão e os processos de vascularização durante sua atuação. Portanto, não é mais possível classificar as citocinas em "boas" e "más", como sugerido, pelo paradigma Th1/Th2 (CHAOUAT et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foi conduzido um estudo caso-controle, composto por 62 mulheres-pacientes, com RSA idiopático, e 76 mulheres-controle pareadas.

As pacientes apresentaram diagnóstico de RSA primário realizado no Hospital de Clínicas da UFPR ou na Clínica Privada Genetika, em Curitiba. Pacientes com RSA primário não apresentam qualquer gestação a termo com o mesmo parceiro e, geralmente o período gestacional não ultrapassa a 20ª semana. Vinte e cinco mulheres sofreram dois abortos, 34 mulheres sofreram entre três e cinco abortos e três mulheres sofreram mais do que cinco abortos. Também foram excluídas causas citogenéticas (o cariótipo do casal era normal), hormonais, anatômicas, doenças infecciosas, doenças auto-imunes, incluindo presença de anticorpos antifosfolipídicos. Os abortamentos foram caracterizados como de etiologia desconhecida. As pacientes, todas provenientes da região sul do Brasil (Paraná) foram classificadas como brancas com ascendência predominantemente européia. A idade média das pacientes foi de 30 anos (variando de 19 a 43).

As 76 mulheres da amostra-controle foram selecionadas e devidamente pareadas com as pacientes atendendo aos critérios de não pertencerem à mesma família, terem tido pelo menos duas gestações bem sucedidas e a termo, pertencerem aos mesmos grupo étnico e condições sócio-econômicas. A idade média das mulheres foi de 41 anos (variando de 23 a 63).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da UFPR (Anexo 1), sendo que pacientes e controles assinaram um termo de consentimento informado (Apêndice 1) para participação do estudo e para a coleta de amostras sanguíneas.

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Dez mililitros (10 mL) de sangue periférico foram coletados de cada indivíduo, através de punção venosa, em tubos estéreis *vacutainer* com EDTA. Essas amostras

foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos da qual foi extraído o DNA pela técnica de *salting-out* (LAHIRI et al., 1991) (Apêndice 2).

4.3 TIPIFICAÇÃO DOS ALELOS DE *IL10*, *TNF* e *IFNG* ATRAVÉS DA TÉCNICA PCR-SSP (REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA - INICIADORES SEQUÊNCIA-ESPECÍFICOS)

Para a tipificação dos alelos de *IL10*, *TNF* e *IFNG* foi utilizado o *kit* comercial, *Cytokine Genotyping Tray* (One-Lambda, Inc, Canoga Park, CA) e a técnica PCR-SSP.

O *Cytokine Genotyping Tray* contém oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) de sequência específica para amplificação dos genes *TNF*, *IL10* e *IFNG*, e do gene que codifica a β -globina (controle interno). Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) estão presentes em diferentes orifícios da placa de tipificação, sobre os quais é adicionada a amostra de DNA, Taq polimerase e mistura de dNTP-tampão (*D-mix*). A quantidade de iniciador é ajustada para amplificar 100 ng da amostra de DNA, quando usada em conjunto com a *D-mix*.

Um par de iniciadores (*primers*) é utilizado como controle interno, que amplifica uma região conservada do gene que codifica a β -globina humana, o qual está presente em todas as amostras de DNA e é usado para verificar a integridade da PCR. No controle negativo da reação, coloca-se água ultra pura (*milli Q*), e não DNA.

Depois do processo da PCR, os fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados após coloração com brometo de etídeo e exposição à luz ultravioleta.

4.3.1 Tipificação dos Alelos de *IL10*, *TNF* e *IFNG*

Para a realização da PCR é utilizado o termociclador *Gene Amp Perkin Elmer PT-9700* (Figura 7), com os seguintes componentes:

FIGURA 7 - TERMOCICLADOR GENE AMP PERKIN ELMER PT-9700



- **Placa com 96 poços** (onde são analisados seis indivíduos) do *Cytokine Genotyping Tray* (One-Lambda, Inc, Canoga Park, CA)^M (Figura 8).

FIGURA 8 - PLACA DE ENSAIO COM 96 POÇOS CYTOKINE GENOTYPING TRAY (ONE-LAMBDA, INC, CANOGA PARK, CA)^M



- **D-MIX** (que contém: tampão da enzima Taq polimerase [mantém o pH em 8,3]; dNTP's e $MgCl_2$) \Rightarrow 180 μ l
- **Taq Polimerase** concentração 5 U/ μ l \Rightarrow 1 μ l (não faz parte do *kit*)
- **DNA** concentração 100 ng/ μ l \Rightarrow 19 μ l (O índice de pureza [A260/A280] das amostras de DNA apresentou uma DO entre 1,65 e 1,80).
- **Água ultra pura (milli Q)**, q.s.p. acertar a concentração do DNA.

Obs: 10 μ l (*D-MIX*+ DNA + Taq polimerase) foram dispensados por poço da placa.

Nota: Tanto a composição da *D-MIX*, como as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), não são detalhados pela *One Lambda, Inc.*

Para a PCR-SSP, foi utilizado o termociclador Perkin-Elmer 9700, programa PCR *One Lambda (OLI-1)*, de acordo com a seguinte série de passos:

Ciclos	Passo	Temp. (° C)	Tempo (Seg)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Fim	1	4	0-∞

O produto da PCR-SSP foi transferido para um gel de agarose a 2,5% usando o *Gel System (OLI Cat. #MGS108)* (Figura 9).

FIGURA 9 - O PRODUTO DA PCR É TRANSFERIDO PARA O GEL



- A realização da corrida de eletroforese ocorreu a 150 V, por 5 minutos.
- O gel de eletroforese foi imerso em solução de brometo de etídeo em TBE (1,6 mg/L) por 10 minutos.
- Os fragmentos amplificados foram visualizados com auxílio da luz ultravioleta no transiluminador (PHARMACIA), e o gel foi fotografado (Figura 10).

4.3.2.1 Interpretação dos resultados para tipificação dos alelos de *IL-10*

O padrão eletroforético, observado após a PCR, foi analisado segundo a ficha de tipagem que acompanha o *kit* (Anexo 2). Os tamanhos dos fragmentos relacionados aos polimorfismos no gene *IL 10* estão indicados a seguir:

300 pb	<i>IL 10</i> *-1082A, <i>IL 10</i> *-819T
300 pb	<i>IL 10</i> *-1082G, <i>IL 10</i> *-819C
300 pb	<i>IL 10</i> *-1082A, <i>IL 10</i> *-819C
250 pb	<i>IL 10</i> *-819T, <i>IL 10</i> *-592A
250 pb	<i>IL 10</i> *-819C, <i>IL 10</i> *-592C

Os genótipos correspondentes às três posições, -1082, -819 e -592, respectivamente, estão relacionados aos seguintes fenótipos para alto, intermediário ou baixo produtor de IL-10, conforme detalhado a seguir (TURNER et al., 1997a):

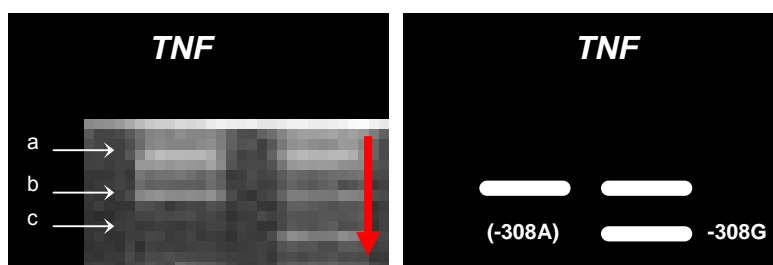
Genótipo	Fenótipo
GG CC CC	alto
GA CC CC	intermediário
GA CT CA	intermediário
AA CC CC	baixo
AA CT CA	baixo
AA TT AA	baixo

4.3.2.2 Interpretação dos resultados para tipificação dos alelos de *TNF*

Os produtos de amplificação do gene *TNF* na posição -308 de sua região promotora são caracterizados por uma banda de 125 pb, e o padrão eletroforético, observado após a PCR, está representado na FIGURA 12. Os genótipos correspondentes aos fenótipos, para baixo e alto produtor de $\text{TNF-}\alpha$ (WILSON et al., 1997), estão relacionados a seguir:

Genótipo	Fenótipo
GG	baixo
GA	alto
AA	alto

FIGURA 12 - PADRÃO ELETROFORÉTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE *TNF*



(a) DNA residual

(b) Controle da amplificação gênica

(c) Amplificação alelo-específica

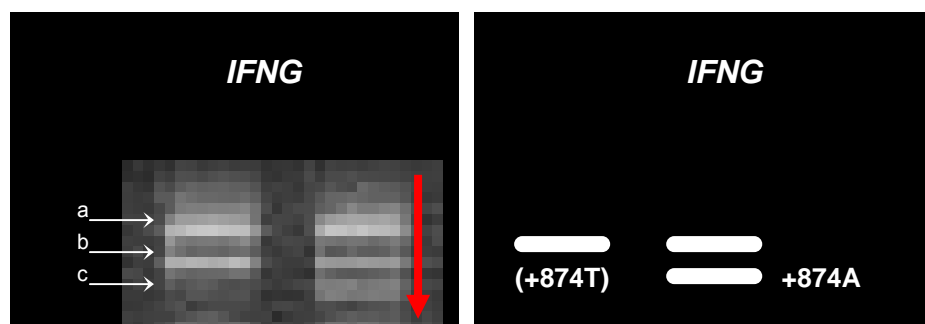
Padrão de PCR-SSP para a posição -308 do gene *IFNG*, utilizando o kit *Cytokine Genotyping Tray* (One-Lambda, Inc, Canoga Park, CA). Pode-se visualizar no gel o resultado da tipagem de um indivíduo, onde as pistas um e dois correspondem respectivamente às posições -308>A e -308>G (bandas de 125 pb), identificando um indivíduo homozigoto GG. A seta em vermelho indica o sentido da corrida eletroforética. No desenho à direita, detalhe somente das bandas à esquerda.

4.3.2.3 Interpretação dos resultados para tipificação dos alelos de *IFNG*

Para o gene *IFNG*, os produtos apresentam 250 pb, estando os SNPs localizados no íntron 1(+874 T>A), e o padrão eletroforético observado após a PCR, está representado na FIGURA 13. Um dos pares de iniciadores (*primers*) detecta o alelo *IFNG**874T, e o outro detecta o alelo *IFNG**874A. Os genótipos correspondentes aos seguintes fenótipos, para alto, intermediário e baixo produtor de IFN- γ (PRAVICA et al., 1999, 2000), estão relacionados a seguir:

Genótipo	Fenótipo
TT	alto
TA	intermediário
AA	baixo

FIGURA 13 - PADRÃO ELETROFORÉTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE *IFNG*



(a) DNA residual

(b) Controle da amplificação gênica

(c) Amplificação alelo-específica

Padrão de PCR-SSP para a posição +874 do gene *IFNG*, utilizando o *kit Cytokine Genotyping Tray* (One-Lambda, Inc, Canoga Park, CA). Pode-se visualizar, no gel, o resultado de um indivíduo, onde as pistas um e dois correspondem respectivamente às posição +874>T e +874>A, identificando um indivíduo homozigoto AA. A seta em vermelho indica o sentido da corrida eletroforética. No desenho à direita, detalhe somente das bandas da foto à esquerda.

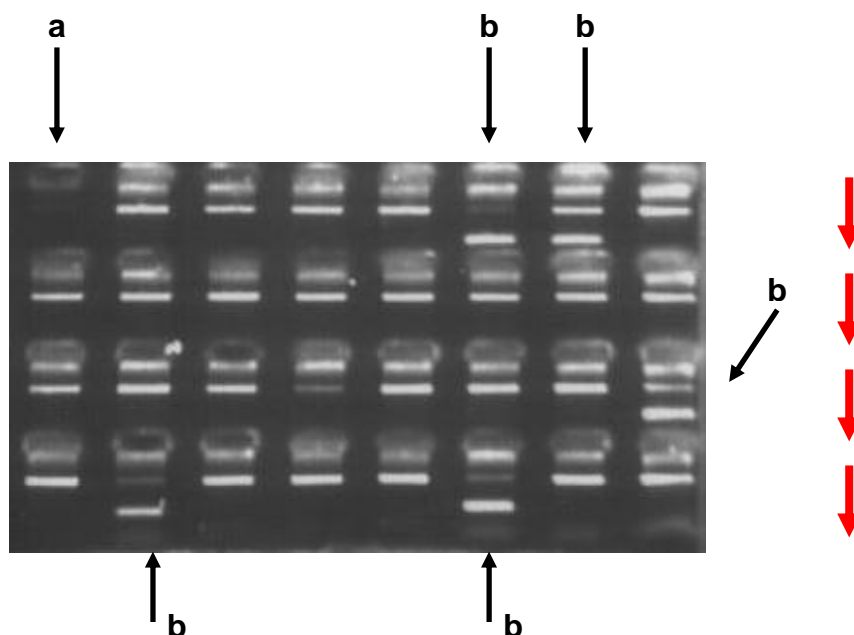
4.4 TIPIFICAÇÃO DOS ALELOS DE *HLA-DQB1* PELA TÉCNICA PCR-SSP

Para a genotipagem dos alelos de *HLA-DQB1* foi utilizado o *kit Micro SSP Allele Specific HLA Class II DNA Typing Tray – DQB1; Cat. ID# SSP2-Q1 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA)^M*, que mediante a técnica PCR-SSP produz a amplificação simultânea e específica de alelos mais frequentes, resultado da especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que se encontram em diferentes poços de uma mesma placa de ensaio. Essa placa contém 96 poços, que se dividem em três conjuntos de 31 poços com especificidades de amplificação diferentes e um poço controle negativo (cada placa permite a análise simultânea de três indivíduos).

4.4.1 Descrição do Método

- Para a realização da PCR foi utilizado o termociclador *Gene Amp Perkin Elmer PT-9700*, com os seguintes componentes:
 - **Placa com 96 poços** (onde foram analisados três indivíduos) *Micro SSPTM Allele Specific HLA Class II DNA Typing Tray – DQB1; Cat. ID# SSP2-Q1 (One-Lambda, Inc., Canoga Park, CA)^M*
 - **D-MIX** (que contém: tampão da enzima Taq polimerase [mantém o pH em 8,3]; dNTP's e MgCl₂) ⇒ 360 µl
 - **Taq Polimerase** concentração 5 U/µl ⇒ 2 µl (não faz parte do *kit*)
 - **DNA** concentração 100 ng/µl ⇒ 3 – 9 µl (O índice de pureza [A260/A280] das amostras de DNA apresentou uma DO entre 1,65 e 1,80).
 - **Água ultra pura (*milli Q*)**, q.s.p. acertar a concentração do DNA.
- Obs:** 10 µl (*D-MIX*+ DNA + Taq polimerase) foram dispensados por poço da placa.
- Como anteriormente descrito para citocinas, após a eletroforese, o gel foi fotografado (Figura 14), as bandas positivas observadas foram anotadas em uma ficha de análise (Anexo 3) permitindo a tipagem dos alelos *HLA-DQB1*. Os resultados dessa atribuição alélica foram também corroborados com auxílio do *software* de análise da *One Lambda*.

FIGURA 14 - PADRÃO ELETROFORÉTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE *HLA-DQB1*



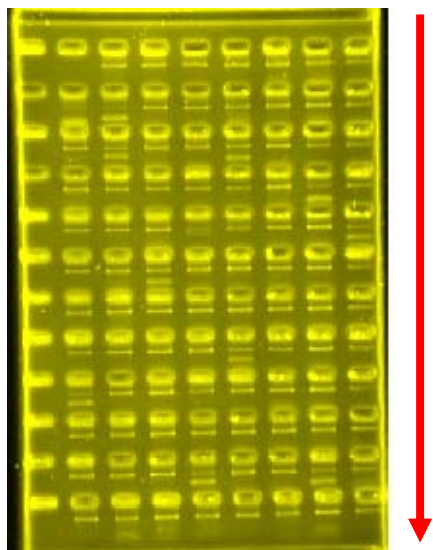
Fotografia de um gel após corrida eletroforética e para tipificar os alelos *HLA-DQB1* utilizando o *kit* comercial “*Micro SSP™ Allele Specific HLA CClass II DNA Typing Tray – DQB1*” (*One-Lambda, Inc, Canoga Park, CA*) de um indivíduo. A flecha “a” indica o controle negativo; as flechas indicadas pela letra “b” indicam as reações positivas; as bandas não-sinalizadas são reações negativas. A seta em vermelho indica o sentido da corrida eletroforética.

4.5 TIPIFICAÇÃO DOS ALELOS DE *HLA-DRB1* PELA TÉCNICA PCR-SSP

Para a genotipagem de alelos de *HLA-DRB1*, a técnica utilizada foi similar às citadas anteriormente, com as seguintes alterações:

- **Placa com 96 poços** “*Micro SSP™ High Resolution HLA CClass II DNA Typing Tray – DRB1*” (*One-Lambda, Inc., Canoga Park, CA*), para um indivíduo.
- **D-MIX**.....1000 µl
- **Taq Polimerase** concentração 5 U/µl.....5,6 µl (não faz parte do *kit*)
- **DNA** concentração 100 ng/µl.....111 µl
- Como anteriormente descrito para citocinas, após a eletroforese o gel foi fotografado (Figura 15), as bandas positivas observadas foram anotadas em uma ficha de análise (Anexo 4) onde foram identificados os alelos *HLA-DRB1*, e os dados da análise foram corroborados com auxílio do *software* de análise da *One Lambda*.

FIGURA 15 - PADRÃO ELETROFORÉTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE *HLA-DRB1*



Fotografia de um gel após corrida eletroforética para tipificar os alelos *HLA-DRB1* utilizando o *kit* comercial “*Micro SSP™ High Resolution HLA Class II Typing Tray – DRB1*” (One-Lambda, Inc, Canoga Park, CA) de um indivíduo. A seta em vermelho indica o sentido da corrida eletroforética.

5 ANÁLISE E TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES ALÉLICAS DE *IL10*, *TNF*, *IFNG*, *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1*

A caracterização das variantes alélicas e atribuição de genótipos foram realizadas, comparando-se os padrões eletroforéticos de amplificação do DNA com os iniciadores nucleotídicos alelo-específicos, de acordo com protocolo do fabricante do *kit*.

5.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E HAPLOTÍPICAS

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta dos alelos através da fórmula:

$$X = n/2N, \text{ onde} \quad \begin{array}{l} X = \text{frequência relativa do alelo} \\ n = \text{frequência absoluta do alelo} \\ N = \text{número total de indivíduos} \end{array}$$

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado de acordo com o procedimento descrito por GUO e THOMPSON conforme detalhado por SCHNEIDER et al. (2.000), usando o software ARLEQUIN 2000. As frequências haplotípicas foram estimadas pelo método da verossimilhança que utiliza o algoritmo EM (maximização de expectativa) que faz parte do conjunto de programas disponíveis no pacote ARLEQUIN. Para a comparação de frequências e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram utilizados os testes do χ^2 e teste exato de Fisher.

5.3 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE *IL10*, *TNF*, *IFNG*, *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1* E ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE

Para a análise de associação foram relacionados o número de pacientes e controles, portadores de cada variante alélica de *IL10*, *TNF*, *IFNG*, *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1* em tabelas de contingência 2x2 (MILLER, 1997). Essa comparação

permitiu testar a hipótese nula (H_0), do alelo em questão, apresentar frequência similar nas amostras paciente e controle.

Os resultados foram interpretados através dos valores de probabilidade (p) obtidos através da análise dos dados pelo teste exato de Fisher. Nos casos em que o valor de p foi significativo ($\leq 0,05$) foi calculado o *Odds Ratio* (razão de probabilidades) (WOOLF, 1955).

6 RESULTADOS

Sessenta e uma mulheres-pacientes com RSA e 75 mulheres-controle foram genotipadas para *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A), com resultados conclusivos.

Foram genotipadas 59 mulheres-pacientes com RSA e 73 mulheres-controle para o gene *HLA-DQB1*, com resultados conclusivos.

Foram genotipadas 59 mulheres-pacientes com RSA e 72 mulheres-controle para o gene *HLA-DRB1*, com resultados conclusivos.

6.1 GENES *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) E *IFNG* (+874 T>A)

6.1.1 Frequências Alélicas de *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) E *IFNG* (+874 T>A) Entre Pacientes Com RSA (N=61) e Mulheres-Controle (N=75)

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as frequências alélicas e de portadores de variantes alélicas de *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) entre mulheres-pacientes com RSA (N=61) e mulheres-controle (N=75) (Tabelas 1A e 1B).

TABELA 1A - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) E *IFNG* (+874 T>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=61) E MULHERES-CONTROLE (N=75)

GENE (Posição)	Alelo	Pacientes (N=61)	Controles (N=75)	<i>p</i>
		n(%)	n(%)	
<i>IL10</i> (-1082)	G	52(43)	59 (39)	0,624
	A	70(57)	91(61)	
<i>IL10</i> (-819)	C	89 (73)	110 (73)	1
	T	33 (27)	40 (27)	
<i>IL10</i> (-592)	A	33 (27)	40 (27)	1
	C	89 (73)	110 (73)	
<i>TNF</i> (-308)	G	106 (87)	132 (88)	0,857
	A	16 (13)	18 (12)	
<i>IFNG</i> (+874)	T	56 (46)	66(44)	0,809
	A	66 (54)	84 (56)	

p=valor de p

TABELA 1B - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE VARIANTES ALÉLICAS DE *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) E *IFNG* (+874 T>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=61) E MULHERES-CONTROLE (N=75)

GENE (Posição)	Alelo	Pacientes (N=61)	Controles (N=75)	P
		n(%)	n(%)	
<i>IL10</i> (-1082)	G	40(65)	51 (68)	0,884
	A	49(80)	66(88)	
<i>IL10</i> (-819)	C	57 (93)	68 (91)	1
	T	29 (48)	34 (45)	
<i>IL10</i> (-592)	A	29 (48)	34 (45)	1
	C	57 (93)	68(91)	
<i>TNF</i> (-308)	G	61 (100)	72 (96)	0,683
	A	16 (26)	15 (20)	
<i>IFNG</i> (+874)	T	41 (67)	51(68)	1
	A	46 (75)	59 (79)	

p =valor de p

6.1.2 Frequências Genotípicas de *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) e Comparação Entre Pacientes Com RSA (N=61) e Mulheres-Controle (N=75)

Da mesma forma quando comparamos as frequências genotípicas de *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) entre pacientes com RSA (N=61) e mulheres-controle (N=75), não foi observada diferença estatística significativa na distribuição dos genótipos entre as mesmas (Tabela 2).

TABELA 2 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) E *IFNG* (+874 T>A) ENTRE AS PACIENTES COM RSA (N=61) E MULHERES-CONTROLE (N=75)

GENE (Posição)	Genótipo	Pacientes (N=61)	Controles (N=75)	<i>p</i>
		n(%)	n(%)	
<i>IL10</i> (-1082)	GG	12 (20)	8 (11)	0,164
	AG	28 (46)	43 (57)	0,336
	AA	21 (34)	24 (32)	0,873
<i>IL10</i> (-819)	CC	32 (52)	41(55)	0,889
	CT	25 (41)	28 (37)	0,761
	TT	4 (7)	6 (8)	1
<i>IL10</i> (-592)	CC	32 (52)	41(55)	0,893
	CA	25 (41)	28 (37)	0,758
	AA	4 (7)	6 (8)	1
<i>TNF</i> (-308)	AA	0 (0)	2 (3)	0,502
	GA	16 (26)	14 (19)	0,343
	GG	45 (74)	59 (78)	0,714
<i>IFNG</i> (+874)	TT	15 (24)	14 (19)	0,439
	TA	26 (43)	38 (50)	0,478
	AA	20(33)	23 (31)	0,870

p: valor de *p*

6.1.3 Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os Genes *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A)

A distribuição dos genótipos relacionados aos polimorfismos nos genes *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A),

tanto na amostra de pacientes com RSA (N=61) como na amostra de mulheres-controle (N=75), permite concluir que ambas as amostras se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3).

TABELA 3 - EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG PARA OS GENES *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A)

Genótipos (posição)	Pacientes (N=61)		Controles (N=75)	
	<i>p</i>	s.d.	<i>p</i>	s.d.
<i>IL10</i> (-1082 G>A)	0,79419	0,00122	0,08842	0,00082
<i>IL10</i> (-819 C>T)	0,73920	0,00144	0,76550	0,00131
<i>IL10</i> (-592 C>A)	0,73689	0,00128	0,76409	0,00131
<i>TNF</i> (-308 G>A)	0,57734	0,00155	0,19410	0,00138
<i>IFNG</i> (+874 T>A)	0,43491	0,00156	0,81309	0,00122

p=valor de p

s.d.= desvio padrão

6.1.4 Frequências Genotípicas de *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) Entre Pacientes Com RSA e Mulheres-Controle Agrupadas de Acordo com o Fenótipo “Produção de Citocinas” (Alto, Intermediário e Baixo)

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de pacientes com RSA (N=61) e mulheres-controle (N=75) (Tabela 4) na análise dos genótipos de *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) agrupados de acordo com os fenótipos alto, intermediário e baixo produtor de citocinas.

TABELA 4 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=61) E MULHERES-CONTROLE (N=75) AGRUPADAS DE ACORDO COM O FENÓTIPO “PRODUÇÃO DE CITOCINAS”

Gene	Posições	Genótipos	Fenótipos*	Pacientes (N=61)	Controles (N=75)	p
				n (%)	n (%)	
<i>IL10</i>	-1082, -819, -592	GG CC CC	Alto	12(20)	8 (11)	0,164
		GA CC CC GA CT CA	Intermediário	28 (46)	43 (57)	0.330
		AA CC CC AA CT CA AA TT AA	Baixo	21 (34)	24 (32)	0.866
<i>TNF</i>	-308	AA/AG	Alto	16 (26)	16 (21)	0.585
		GG	Baixo	45 (74)	59 (79)	0,714
<i>IFNG</i>	+874	TT	Alto	15 (24)	14 (19)	0,439
		TA	Intermediário	26 (43)	38 (50)	0,478
		AA	Baixo	20 (33)	23 (31)	0,870

p: valor de p

(*) Fenótipos para produção das citocinas de acordo com Perrey et al. (1998,1999).

6.2 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS COMBINADAS DE *TNF* (-308 G>A) E *IFNG* (+874 T>A) E RESPECTIVOS FENÓTIPOS “PRODUÇÃO DE CITOCINAS” (ALTO, INTERMEDIÁRIO E BAIXO) ENTRE PACIENTES COM RSA E MULHERES-CONTROLE

A análise combinada das distribuições genotípicas e respectivos fenótipos alto, intermediário e baixo produtor de citocinas $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$ (categorizados como pró-inflamatórios) permitiu concluir que genótipos e respectivos fenótipos

apresentam distribuição semelhante nas amostras de pacientes com RSA (N=61) e mulheres-controle (N=75) (Tabela 5).

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS COMBINADAS DE *TNF* (-308 G>A) E *IFNG* (+874 T>A), CATEGORIZADAS CONFORME FENÓTIPOS “PRODUÇÃO DE CITOCINAS” ENTRE PACIENTES COM RSA (N=61) E MULHERES-CONTROLE (N=75)

Genótipo (Fenótipo)		Pacientes (N=61)		Controles (N=75)		p
<i>TNF</i> -308	<i>IFNG</i> +874	n	%	n	%	
GG (baixo)	AA (alto)	14	23	21	28	0,558
GG (baixo)	TA (alto)	19	31	29	39	0,377
GG (baixo)	TT (baixo)	12	20	10	13	0,352
GA (alto)	AA (alto)	6	10	3	4	0,299
GA (alto)	TA (intermediário)	7	11	6	8	0,237
GA (alto)	TT (baixo)	3	5	4	5	1
AA (alto)	TA (intermediário)	0	0	2	3	0,507

p: valor de p

6.3 GENES *HLA-DQB1* E *HLA-DRB1*

6.3.1 Gene *HLA-DQB1*

6.3.1.1 Frequências alélicas e dos grupos alélicos de *HLA-DQB1*

A distribuição das frequências de portadores de alelos de *HLA-DQB1* foi similar na amostra de pacientes com RSA (N=59) e mulheres-controle (N=73) e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando se compararam as amostras (Tabela 6).

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE ALELOS DE *HLA-DQB1* ENTRE PACIENTES COM RSA (N=59) E MULHERES-CONTROLE (N=73)

Alelo	Pacientes (N=59)		Controles (N=73)		<i>p</i>
	n	%	n	%	
<i>DQB1*0201</i>	8	13,56	10	13,70	1
<i>DQB1*0202</i>	5	8,47	16	21,92	0,225
<i>DQB1*0301</i>	22	37,29	34	46,57	0,292
<i>DQB1*0302</i>	13	22,03	17	23,29	1
<i>DQB1*0303</i>	5	8,47	5	6,85	1
<i>DQB1*0304</i>	0	0,00	1	1,37	-
<i>DQB1*0313</i>	0	0,00	1	1,37	-
<i>DQB1*0402</i>	7	11,86	9	12,33	1
<i>DQB1*0501</i>	16	27,12	13	17,81	0,208
<i>DQB1*0502</i>	6	10,17	4	5,48	0,346
<i>DQB1*0503</i>	5	8,47	5	6,85	0,751
<i>DQB1*0601</i>	3	5,08	2	2,74	0,658
<i>DQB1*0602</i>	6	10,17	9	12,33	0,783
<i>DQB1*0603</i>	12	20,34	10	13,70	0,819
<i>DQB1*0604</i>	2	3,39	3	4,11	1
<i>DQB1*0609</i>	2	3,39	0	0,00	0,191
<i>DQB1*0611</i>	0	0,00	1	1,37	-
<i>DQB1*0614</i>	0	0,00	1	1,37	-

p: valor de *p*

Quando comparadas às frequências dos portadores de grupos alélicos de *HLA-DQB1* entre pacientes com RSA e mulheres-controle, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras (Tabela 7).

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS PORTADORES DE GRUPOS ALÉLICOS DE *HLA-DQB1* ENTRE PACIENTES COM RSA (N=59) E MULHERES-CONTROLE (N=73)

Grupo Alélico	Pacientes (N=59)		Controles (N=73)		p
	n	%	n	%	
<i>DQB1*02</i>	13	22,03	26	35,62	0,123
<i>DQB1*03</i>	40	67,80	58	79,45	0,159
<i>DQB1*04</i>	7	11,86	9	12,32	1
<i>DQB1*05</i>	27	45,76	22	30,14	0,076
<i>DQB1*06</i>	25	42,37	26	35,62	0,523

p: valor de p

6.3.1.2 Frequências genotípicas de *HLA-DQB1*

Foram comparadas as frequências genotípicas (>0,01) de *HLA-DQB1* entre as amostras de pacientes com RSA (N=59) e mulheres-controle (N=73), e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre as amostras (Tabela 8).

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS (>0,01) DE *HLA-DQB1* ENTRE PACIENTES COM RSA (N=59) E MULHERES-CONTROLE (N=73)

Genótipo	Pacientes (N=59)		Controles (N=73)		p
	n	%	n	%	
<i>DQB1*0201 -DQB1*0301</i>	2	3,39	4	5,48	0,690
<i>DQB1*0201 -DQB1*0303</i>	0	0,00	2	2,74	0,501
<i>DQB1*0201 -DQB1*0501</i>	4	6,78	1	1,37	0,166
<i>DQB1*0202 -DQB1*0301</i>	0	0,00	5	6,85	0,067
<i>DQB1*0202 -DQB1*0302</i>	1	1,69	3	4,11	0,628
<i>DQB1*0202 -DQB1*0501</i>	0	0,00	4	5,48	0,130
<i>DQB1*0301 -DQB1*0301</i>	2	3,39	3	4,11	1
<i>DQB1*0301 -DQB1*0302</i>	5	8,47	2	2,74	0,244
<i>DQB1*0301 -DQB1*0402</i>	2	3,39	4	5,48	0,688
<i>DQB1*0301 -DQB1*0501</i>	3	5,08	3	4,11	1
<i>DQB1*0301 -DQB1*0602</i>	2	3,39	2	2,74	1
<i>DQB1*0301 -DQB1*0603</i>	3	5,08	3	4,11	1
<i>DQB1*0301 -DQB1*0604</i>	1	1,69	3	4,11	0,629
<i>DQB1*0302 -DQB1*0603</i>	3	5,08	2	2,74	0,660
<i>DQB1*0501 -DQB1*0603</i>	3	5,08	1	1,37	0,319

p: valor de

A distribuição dos genótipos de *HLA-DQB1* agrupados foi similar entre pacientes com RSA e mulheres-controle, com exceção do genótipo *HLA-DQB1*02/HLA-DQB1*03* que apresentou diferença estatisticamente significativa entre as amostras ($p=0,011$; *Odds Ratio*= 0,21 e IC[95%]=0,06 – 0,75), com uma frequência maior na amostra controle (Tabela 9).

TABELA 9 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS (POR GRUPO ALÉLICO) DE *HLA-DQB1* ENTRE PACIENTES COM RSA (N=59) E MULHERES-CONTROLE (N=73)

Genótipo	Pacientes (N=59)		Controles (N=73)		<i>p</i>	OR (IC 95%)
	n	%	n	%		
<i>DQB1*02 -DQB1*02</i>	1	1,69	0	0,00	-	-
<i>DQB1*02 -DQB1*03</i>	3	5,08	15	20,55	0,011	0,21 (0,06-0,75)
<i>DQB1*02 -DQB1*04</i>	2	3,39	1	1,37	0,586	-
<i>DQB1*02 -DQB1*05</i>	6	10,17	5	6,85	0,542	-
<i>DQB1*02 -DQB1*06</i>	1	1,69	5	6,85	0,225	-
<i>DQB1*03 -DQB1*03</i>	9	15,25	11	15,07	1,000	-
<i>DQB1*03 -DQB1*04</i>	3	5,08	6	8,22	0,727	-
<i>DQB1*03 -DQB1*05</i>	8	13,56	7	9,59	0,578	-
<i>DQB1*03 -DQB1*06</i>	11	18,64	12	16,44	0,820	-
<i>DQB1*04 -DQB1*05</i>	1	1,69	1	1,37	-	-
<i>DQB1*04 -DQB1*06</i>	1	1,69	1	1,37	-	-
<i>DQB1*05 -DQB1*05</i>	4	6,78	2	2,74	0,409	-
<i>DQB1*05 -DQB1*06</i>	6	10,17	6	8,22	0,768	-
<i>DQB1*06 -DQB1*06</i>	3	5,08	1	1,37	0,324	-

p: Valor de *p*; OR: *Odds Ratio*; IC=Intervalo de Confiança.

6.3.1.3 Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o gene *HLA-DQB1*

As distribuições dos genótipos relacionados ao gene *HLA-DQB1* permitiram evidenciar o equilíbrio de Hardy-Weinberg nas amostras de pacientes com RSA ($p=0,230$; d.s.[desvio padrão]=0,00031) e de mulheres-controle ($p=0,992$; d.s.(desvio padrão)=0,00009).

6.3.2 Gene *HLA-DRB1*

6.3.2.1 Freqüências alélicas e de grupos alélicos de *HLA-DRB1*

A distribuição das freqüências de portadores de variantes alélicas de *HLA-DRB1* entre pacientes com RSA e mulheres-controle foi similar, exceto com relação ao alelo *HLA-DRB1*1104* ($\rho=0,045$) que apresentou maior freqüência na amostra paciente. O valor do *Odds Ratio* foi de 6,76 (0,67-57,71) com índice de confiança de 95% (Tabela 10).

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS (>0,01) DE PORTADORES DE VARIANTES ALÉLICAS DE *HLA-DRB1* ENTRE PACIENTES COM RSA (N=59) E MULHERES-CONTROLE (N=72)

Alelos	Pacientes (N=59)		Controles (N=72)		<i>p</i>	OR (IC 95%)
	n	%	n	%		
<i>DRB1*0101</i>	10	16,95	6	8,33	0,186	-
<i>DRB1*0102</i>	3	5,08	3	4,17	1	-
<i>DRB1*0301</i>	8	13,56	10	13,89	1	-
<i>DRB1*0401</i>	2	3,39	2	2,78	1	-
<i>DRB1*0402</i>	4	6,78	6	8,33	1	-
<i>DRB1*0404</i>	3	5,08	3	4,17	1	-
<i>DRB1*0405</i>	2	3,39	4	5,56	0,690	-
<i>DRB1*0701</i>	9	15,25	16	22,22	0,367	-
<i>DRB1*0801</i>	3	5,08	4	5,56	1	-
<i>DRB1*0802</i>	2	3,39	4	5,56	0,694	-
<i>DRB1*0901</i>	0	0,00	4	5,56	0,131	-
<i>DRB1*1001</i>	1	1,69	4	5,56	0,382	-
<i>DRB1*1101</i>	8	13,56	16	22,22	0,288	-
<i>DRB1*1102</i>	1	1,69	0	0,00	0,446	-
<i>DRB1*1104</i>	6	10,17	1	1,39	0,045	6,76 (0,67-57,71)
<i>DRB1*1201</i>	4	6,78	9	12,50	0,393	-
<i>DRB1*1301</i>	10	16,95	13	18,06	1	-
<i>DRB1*1302</i>	5	8,47	2	2,78	0,254	-
<i>DRB1*1303</i>	1	1,69	4	5,56	0,391	-
<i>DRB1*1401</i>	5	8,47	5	6,94	0,755	-
<i>DRB1*1402</i>	1	1,69	3	4,17	0,632	-
<i>DRB1*1501</i>	6	10,17	7	9,72	1	-
<i>DRB1*1502</i>	3	5,08	1	1,39	0,334	-
<i>DRB1*1601</i>	3	5,08	3	4,17	1	-
<i>DRB1*1602</i>	1	1,69	3	4,17	0,632	-

ρ =valor de p

OR= *Odds Ratio*

IC= Intervalo de confiança

Nas análises e comparações de portadores de grupos alélicos de *HLA-DRB1* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de pacientes com RSA (N=59) e mulheres-controle (N=72) (Tabela 11).

TABELA 11 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE GRUPO ALÉLICO DE *HLA-DRB1* ENTRE PACIENTES COM RSA (N=59) E MULHERES-CONTROLE (N=72)

Grupo Alélico	Pacientes (N=59)		Controles (N=72)		p
	n	%	n	%	
<i>DRB1*01</i>	15	25,42	10	13,89	0,134
<i>DRB1*03</i>	8	13,56	10	13,89	1
<i>DRB1*04</i>	15	25,42	18	25,00	1
<i>DRB1*07</i>	9	15,25	16	22,22	0,371
<i>DRB1*08</i>	8	13,56	10	13,89	1
<i>DRB1*09</i>	0	0,00	4	5,56	0,133
<i>DRB1*10</i>	1	1,69	4	5,56	0,389
<i>DRB1*11</i>	16	27,12	19	26,39	1
<i>DRB1*12</i>	4	6,78	9	12,50	0,393
<i>DRB1*13</i>	18	30,51	19	26,39	0,723
<i>DRB1*14</i>	7	11,86	10	13,89	0,810
<i>DRB1*15</i>	10	16,95	9	12,50	0,620
<i>DRB1*16</i>	4	6,78	6	8,33	1

ρ =valor de p

6.3.2.2 Equilíbrio de HARDY-WEINBERG para o gene *HLA-DRB1*

As distribuições dos genótipos relacionados ao gene *HLA-DRB1* permitiram concluir que as amostras de pacientes com RSA ($\rho=0,577$; d.s.[desvio padrão]=0,00149) e mulheres-controle ($\rho=0,166$; d.s.[desvio padrão]=0,00137), se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

6.3.2.3 Frequências haplotípicas de *HLA-DRB1/HLA-DQB1* em pacientes e controles

As frequências haplotípicas ($>0,01$) de *HLA-DRB1/HLA-DQB1* foram comparadas entre pacientes com RSA e mulheres-controle, e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na distribuição dos haplótipos (Tabela 12).

TABELA 12 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS ($>0,01$) DE *HLA-DRB1/HLA-DQB1* ENTRE PACIENTES COM RSA (N=57) E MULHERES-CONTROLE (N=71)

Haplótipo		Pacientes (N=57)		Controles (N=71)		p
		n	%	n	%	
<i>DRB1*0101</i>	<i>DQB1*0501</i>	5	4,39	12	8,45	0,209
<i>DRB1*0102</i>	<i>DQB1*0501</i>	2	1,75	4	2,82	0,693
<i>DRB1*0301</i>	<i>DQB1*0201</i>	7	6,14	10	7,04	0,803
<i>DRB1*0402</i>	<i>DQB1*0302</i>	3	2,63	4	2,82	1
<i>DRB1*0404</i>	<i>DQB1*0302</i>	2	1,75	4	2,82	0,694
<i>DRB1*0405</i>	<i>DQB1*0302</i>	2	1,75	2	1,41	1
<i>DRB1*0701</i>	<i>DQB1*0202</i>	12	10,53	6	4,23	0,088
<i>DRB1*0701</i>	<i>DQB1*0303</i>	2	1,75	6	4,23	0,298
<i>DRB1*0801</i>	<i>DQB1*0402</i>	2	1,75	4	2,82	0,691
<i>DRB1*0802</i>	<i>DQB1*0402</i>	2	1,75	2	1,41	1
<i>DRB1*1001</i>	<i>DQB1*0501</i>	3	2,63	1	0,70	0,322
<i>DRB1*1101</i>	<i>DQB1*0301</i>	12	10,53	8	5,63	0,244
<i>DRB1*1201</i>	<i>DQB1*0301</i>	6	5,26	4	2,82	0,346
<i>DRB1*1301</i>	<i>DQB1*0603</i>	7	6,14	11	7,75	0,634
<i>DRB1*1302</i>	<i>DQB1*0301</i>	2	1,75	0	0,00	0,203
<i>DRB1*1303</i>	<i>DQB1*0301</i>	2	1,75	1	0,70	0,589
<i>DRB1*1401</i>	<i>DQB1*0503</i>	3	2,63	5	3,52	0,734
<i>DRB1*1402</i>	<i>DQB1*0301</i>	2	1,75	1	0,70	0,592
<i>DRB1*1401</i>	<i>DQB1*0602</i>	2	1,75	0	0,00	0,203
<i>DRB1*1501</i>	<i>DQB1*0602</i>	5	4,39	4	2,82	0,737
<i>DRB1*1601</i>	<i>DQB1*0502</i>	2	1,75	4	2,82	0,695
<i>DRB1*1602</i>	<i>DQB1*0301</i>	2	1,75	1	0,70	0,587

p: valor de p

A comparação da distribuição dos haplótipos de *HLA-DRB1/HLA-DQB1*, considerando-se os grupos alélicos entre pacientes com RSA e mulheres-controle, foi similar e não apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 13).

TABELA 13 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DE *HLA-DRB1/HLA-DQB1* (GRUPOS ALÉLICOS) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=57) E MULHERES-CONTROLE (N=71)

Haplótipo		Pacientes (N=57)		Controles (N=71)		p
		n	%	n	%	
<i>DRB1*01</i>	<i>DQB1*05</i>	14	12,28	10	7,04	0,199
<i>DRB1*03</i>	<i>DQB1*02</i>	8	7,02	10	7,04	1
<i>DRB1*04</i>	<i>DQB1*03</i>	14	12,28	18	12,68	1
<i>DRB1*07</i>	<i>DQB1*02</i>	5	4,39	14	9,86	0,154
<i>DRB1*07</i>	<i>DQB1*03</i>	5	4,39	2	1,41	0,246
<i>DRB1*07</i>	<i>DQB1*05</i>	1	0,88	0	0,00	-
<i>DRB1*08</i>	<i>DQB1*03</i>	2	1,75	0	0,00	-
<i>DRB1*08</i>	<i>DQB1*04</i>	6	5,26	8	5,63	1
<i>DRB1*08</i>	<i>DQB1*06</i>	0	0,00	2	1,41	0,506
<i>DRB1*09</i>	<i>DQB1*02</i>	0	0,00	1	0,70	-
<i>DRB1*09</i>	<i>DQB1*03</i>	0	0,00	2	1,41	-
<i>DRB1*10</i>	<i>DQB1*05</i>	1	0,88	4	2,82	0,387
<i>DRB1*11</i>	<i>DQB1*03</i>	15	13,16	18	12,68	1
<i>DRB1*11</i>	<i>DQB1*06</i>	2	1,75	1	0,70	0,585
<i>DRB1*12</i>	<i>DQB1*03</i>	3	2,63	8	5,63	0,362
<i>DRB1*12</i>	<i>DQB1*04</i>	0	0,00	1	0,70	-
<i>DRB1*12</i>	<i>DQB1*05</i>	1	0,88	0	0,00	-
<i>DRB1*13</i>	<i>DQB1*03</i>	2	1,75	6	4,23	0,303
<i>DRB1*13</i>	<i>DQB1*06</i>	14	12,28	13	9,15	0,415
<i>DRB1*14</i>	<i>DQB1*03</i>	1	0,88	4	2,82	0,389
<i>DRB1*14</i>	<i>DQB1*05</i>	6	5,26	5	3,52	0,54
<i>DRB1*15</i>	<i>DQB1*05</i>	3	2,63	0	0,00	0,087
<i>DRB1*15</i>	<i>DQB1*06</i>	7	6,14	10	7,04	0,803
<i>DRB1*16</i>	<i>DQB1*03</i>	1	0,88	1	0,70	-
<i>DRB1*16</i>	<i>DQB1*05</i>	3	2,63	4	2,82	1

p: valor de p

6.4 ALELOS DE *HLA-DRB1* E *IL-10* (-1082 G>A e -592 C>A), HAPLÓTIPOS DE *HLA-DRB1/TNF* (-308 A>G) E ALELOS DE *HLA-DRB1* E *IFNG* (+874 T>A)

6.4.1 Frequências Combinadas de *HLA-DRB1* e *IL10* (-1082 G>A) em Pacientes e Mulheres-Controle

A análise combinada de portadores de variantes alélicas de *HLA-DRB1* e de *IL10* (-1082 G>A), com frequência superior a 1%, nas amostras de pacientes com RSA e mulheres-controle, apresentou distribuição similar entre as mesmas (Tabela 14).

TABELA 14 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE COMBINAÇÕES DE VARIANTES ALÉLICAS (>0,01) DE *HLA-DRB1* E *IL10* (-1082 G>A) ENTRE PACIENTES (N=58) COM RSA E MULHERES-CONTROLE (N=70)

Alelos		Pacientes (N=58)		Controles (N=70)		p
		n	%	n	%	
<i>DRB1*0101</i>	<i>IL10-1082*G</i>	8	6,90	6	4,29	0,418
<i>DRB1*0301</i>	<i>IL10-1082*A</i>	3	2,59	3	2,14	1
<i>DRB1*0301</i>	<i>IL10-1082*G</i>	5	4,31	6	4,29	1
<i>DRB1*0402</i>	<i>IL10-1082*A</i>	2	1,72	4	2,86	0,692
<i>DRB1*0404</i>	<i>IL10-1082*A</i>	3	2,59	3	2,14	1
<i>DRB1*0405</i>	<i>IL10-1082*A</i>	2	1,72	2	1,43	1
<i>DRB1*0701</i>	<i>IL10-1082*A</i>	11	9,48	11	7,86	0,658
<i>DRB1*0701</i>	<i>IL10-1082*G</i>	0	0,00	5	3,57	0,067
<i>DRB1*0801</i>	<i>IL10-1082*A</i>	3	2,59	0	0,00	0,091
<i>DRB1*0801</i>	<i>IL10-1082*G</i>	0	0,00	3	2,14	0,254
<i>DRB1*0802</i>	<i>IL10-1082*A</i>	1	0,86	4	2,86	0,379
<i>DRB1*1001</i>	<i>IL10-1082*A</i>	1	0,86	4	2,86	0,379
<i>DRB1*1101</i>	<i>IL10-1082*A</i>	4	3,45	12	8,57	0,121
<i>DRB1*1101</i>	<i>IL10-1082*G</i>	7	6,03	4	2,86	0,277
<i>DRB1*1104</i>	<i>IL10-1082*A</i>	5	4,31	1	0,71	0,098
<i>DRB1*1201</i>	<i>IL10-1082*A</i>	4	3,45	4	2,86	1
<i>DRB1*1201</i>	<i>IL10-1082*G</i>	0	0,00	4	2,86	0,131
<i>DRB1*1301</i>	<i>IL10-1082*A</i>	3	2,59	5	3,57	0,732
<i>DRB1*1301</i>	<i>IL10-1082*G</i>	7	6,03	8	5,71	1
<i>DRB1*1302</i>	<i>IL10-1082*G</i>	4	3,45	1	0,71	0,179
<i>DRB1*1303</i>	<i>IL10-1082*G</i>	0	0,00	3	2,14	0,255
<i>DRB1*1401</i>	<i>IL10-1082*A</i>	3	2,59	2	1,43	0,661
<i>DRB1*1401</i>	<i>IL10-1082*G</i>	2	1,72	4	2,86	0,692
<i>DRB1*1402</i>	<i>IL10-1082*A</i>	0	0,00	3	2,14	0,254
<i>DRB1*1501</i>	<i>IL10-1082*A</i>	6	5,17	7	5,00	1
<i>DRB1*1502</i>	<i>IL10-1082*A</i>	3	2,59	1	0,71	0,338
<i>DRB1*1601</i>	<i>IL10-1082*A</i>	1	0,86	3	2,14	0,628
<i>DRB1*1602</i>	<i>IL10-1082*G</i>	0	0,00	3	2,14	0,252

p: valor de p

Da mesma forma, a distribuição combinada de portadores de grupos alélicos de *HLA-DRB1* e alelos de *IL10* (-1082 G>A) entre as amostras de pacientes com RSA e mulheres-controle foi similar (Tabela 15).

TABELA 15 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE COMBINAÇÕES DE GRUPOS ALÉLICOS DE *HLA-DRB1* E VARIANTES ALÉLICAS DE *IL10* (-1082 G>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E MULHERES-CONTROLE (N=70)

Grupo Alélico	Alelo	Pacientes (N=58)		Controles (N=70)		<i>p</i>
		n	%	n	%	
<i>DRB1*01</i>	<i>IL10-1082*A</i>	4	3,45	2	1,43	0,416
<i>DRB1*01</i>	<i>IL10-1082*G</i>	10	8,62	8	5,71	0,453
<i>DRB1*03</i>	<i>IL10-1082*A</i>	3	2,59	3	2,14	1
<i>DRB1*03</i>	<i>IL10-1082*G</i>	5	4,31	6	4,29	1
<i>DRB1*04</i>	<i>IL10-1082*A</i>	9	7,76	12	8,57	1
<i>DRB1*04</i>	<i>IL10-1082*G</i>	5	4,31	6	4,29	1
<i>DRB1*07</i>	<i>IL10-1082*A</i>	11	9,48	11	7,86	0,656
<i>DRB1*07</i>	<i>IL10-1082*G</i>	0	0,00	5	3,57	0,062
<i>DRB1*08</i>	<i>IL10-1082*A</i>	5	4,31	6	4,29	1
<i>DRB1*08</i>	<i>IL10-1082*A</i>	3	2,59	3	2,14	1
<i>DRB1*09</i>	<i>IL10-1082*A</i>	0	0,00	2	1,43	0,501
<i>DRB1*09</i>	<i>IL10-1082*G</i>	0	0,00	2	1,43	0,501
<i>DRB1*10</i>	<i>IL10-1082*A</i>	1	0,86	4	2,86	0,379
<i>DRB1*11</i>	<i>IL10-1082*A</i>	7	6,03	14	10,00	0,366
<i>DRB1*11</i>	<i>IL10-1082*G</i>	10	8,62	5	3,57	0,103
<i>DRB1*12</i>	<i>IL10-1082*A</i>	0	0,00	4	2,86	0,130
<i>DRB1*12</i>	<i>IL10-1082*G</i>	4	3,45	4	2,86	1
<i>DRB1*13</i>	<i>IL10-1082*A</i>	6	5,17	7	5,00	1
<i>DRB1*13</i>	<i>IL10-1082*G</i>	11	9,48	11	7,86	0,653
<i>DRB1*14</i>	<i>IL10-1082*A</i>	3	2,59	6	4,29	0,522
<i>DRB1*14</i>	<i>IL10-1082*G</i>	4	3,45	4	2,86	1
<i>DRB1*15</i>	<i>IL10-1082*A</i>	10	8,62	9	6,43	0,633
<i>DRB1*15</i>	<i>IL10-1082*G</i>	1	0,86	0	0,00	0,453
<i>DRB1*16</i>	<i>IL10-1082*A</i>	2	1,72	3	2,14	1
<i>DRB1*16</i>	<i>IL10-1082*G</i>	2	1,72	3	2,14	1

p=valor de *p*

6.4.2 Frequências Combinadas de *HLA-DRB1* e *IL10* (-592 C>A) em Pacientes e Controles

A análise da distribuição de portadores de variantes alélicas de alelos de *HLA-DRB1* e *IL10* (-592 C>A), com frequência superior a 1%, nas amostras de pacientes com RSA e mulheres-controle foi realizada, e não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as mesmas (Tabela 16).

TABELA 16 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS (>0,01) DE PORTADORES DE COMBINAÇÕES DE VARIANTES ALÉLICAS DE *HLA-DRB1* E *IL10* (-592 C>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E MULHERES-CONTROLE (N=70)

Alelos		Pacientes (N=58)		Controles (N=70)		p
		n	%	n	%	
<i>DRB1*0101</i>	<i>IL10-592*C</i>	9	7,76	5	3,57	0,176
<i>DRB1*0301</i>	<i>IL10-592*C</i>	7	6,03	9	6,43	1
<i>DRB1*0402</i>	<i>IL10-592*A</i>	3	2,59	1	0,71	0,333
<i>DRB1*0402</i>	<i>IL10-592*C</i>	0	0,00	5	3,57	0,065
<i>DRB1*0404</i>	<i>IL10-592*C</i>	3	2,59	3	2,14	1
<i>DRB1*0701</i>	<i>IL10-592*A</i>	3	2,59	2	1,43	0,665
<i>DRB1*0701</i>	<i>IL10-592*C</i>	8	6,90	14	10,00	0,497
<i>DRB1*0801</i>	<i>IL10-592*C</i>	3	2,59	3	2,14	1
<i>DRB1*0802</i>	<i>IL10-592*C</i>	2	1,72	2	1,43	1
<i>DRB1*0901</i>	<i>IL10-592*C</i>	0	0,00	4	2,86	0,130
<i>DRB1*1001</i>	<i>IL10-592*C</i>	1	0,86	4	2,86	0,381
<i>DRB1*1101</i>	<i>IL10-592*A</i>	1	0,86	7	5,00	0,076
<i>DRB1*1101</i>	<i>IL10-592*C</i>	8	6,90	9	6,43	1
<i>DRB1*1104</i>	<i>IL10-592*C</i>	5	4,31	1	0,71	0,091
<i>DRB1*1201</i>	<i>IL10-592*A</i>	2	1,72	3	2,14	1
<i>DRB1*1201</i>	<i>IL10-592*C</i>	2	1,72	5	3,57	0,461
<i>DRB1*1301</i>	<i>IL10-592*A</i>	4	3,45	4	2,86	1
<i>DRB1*1301</i>	<i>IL10-592*C</i>	6	5,17	9	6,43	0,788
<i>DRB1*1302</i>	<i>IL10-592*C</i>	5	4,31	2	1,43	0,248
<i>DRB1*1303</i>	<i>IL10-592*C</i>	1	0,86	3	2,14	0,625
<i>DRB1*1401</i>	<i>IL10-592*A</i>	3	2,59	0	0,00	0,091
<i>DRB1*1401</i>	<i>IL10-592*C</i>	2	1,72	6	4,29	0,298
<i>DRB1*1402</i>	<i>IL10-592*A</i>	1	0,86	3	2,14	0,630
<i>DRB1*1501</i>	<i>IL10-592*A</i>	3	2,59	4	2,86	1
<i>DRB1*1501</i>	<i>IL10-592*C</i>	4	3,45	3	2,14	0,704
<i>DRB1*1502</i>	<i>IL10-592*C</i>	3	2,59	1	0,71	0,333

p: valor de p

As comparações de portadores de combinações de grupos alélicos de *HLA-DRB1* e *IL10* (-592 C>A) permitiram concluir por distribuições similares entre pacientes com RSA e mulheres-controle (Tabela 17).

TABELA 17 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE COMBINAÇÕES DE GRUPOS ALÉLICOS DE *HLA-DRB1* E VARIANTES ALÉLICAS DE *IL10* (-592 C>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E MULHERES-CONTROLE (N=70)

Grupo alélico	Alelo	Pacientes (N=58)		Controles (N=70)		p
		n	%	n	%	
<i>DRB1*01</i>	<i>IL10-592*A</i>	3	2,59	1	0,71	0.328
<i>DRB1*01</i>	<i>IL10-592*C</i>	11	9,48	9	6,43	0,489
<i>DRB1*03</i>	<i>IL10-592*A</i>	1	0,86	0	0,00	0.457
<i>DRB1*03</i>	<i>IL10-592*C</i>	7	6,03	9	6,43	1
<i>DRB1*04</i>	<i>IL10-592*A</i>	4	3,45	5	3,57	1
<i>DRB1*04</i>	<i>IL10-592*C</i>	10	8,62	13	9,29	1
<i>DRB1*07</i>	<i>IL10-592*A</i>	3	2,59	2	1,43	0,662
<i>DRB1*07</i>	<i>IL10-592*C</i>	8	6,90	14	10,00	0.505
<i>DRB1*08</i>	<i>IL10-592*A</i>	3	2,59	4	2,86	1
<i>DRB1*08</i>	<i>IL10-592*C</i>	5	4,31	5	3,57	0,759
<i>DRB1*09</i>	<i>IL10-592*C</i>	0	0,00	4	2,86	0.128
<i>DRB1*10</i>	<i>IL10-592*C</i>	1	0,86	4	2,86	0,374
<i>DRB1*11</i>	<i>IL10-592*A</i>	2	1,72	7	5,00	0.189
<i>DRB1*11</i>	<i>IL10-592*C</i>	15	12,93	12	8,57	0,310
<i>DRB1*12</i>	<i>IL10-592*A</i>	2	1,72	3	2,14	1
<i>DRB1*12</i>	<i>IL10-592*C</i>	2	1,72	5	3,57	0.463
<i>DRB1*13</i>	<i>IL10-592*A</i>	4	3,45	4	2,86	1
<i>DRB1*13</i>	<i>IL10-592*C</i>	13	11,21	14	10,00	0,840
<i>DRB1*14</i>	<i>IL10-592*A</i>	4	3,45	4	2,86	1
<i>DRB1*14</i>	<i>IL10-592*C</i>	3	2,59	6	4,29	0.518
<i>DRB1*15</i>	<i>IL10-592*A</i>	3	2,59	5	3,57	0,735
<i>DRB1*15</i>	<i>IL10-592*C</i>	8	6,90	4	2,86	0.144
<i>DRB1*16</i>	<i>IL10-592*A</i>	2	1,72	2	1,43	1
<i>DRB1*16</i>	<i>IL10-592*C</i>	2	1,72	4	2,86	0,691

ρ = valor de p

6.4.3 Frequências Haplotípicas de *HLA-DRB1/TNF* (-308 G>A) em Pacientes Com RSA e Mulheres-Controle

A comparação da distribuição dos haplótipos de *HLA-DRB1* e *TNF* (-308 G>A) entre pacientes com RSA e mulheres-controle foi similar (Tabela 18).

TABELA 18 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS (>0,01) DOS HAPLÓTIPOS *HLA-DRB1/TNF* (-308 G>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E CONTROLES (N=70)

Haplótipos		Pacientes (N=58)		Controles (N=70)		p
		n	%	n	%	
<i>DRB1*0101</i>	<i>TNF-308*A</i>	5	4,31	1	0,71	0,097
<i>DRB1*0101</i>	<i>TNF-308*G</i>	5	4,31	5	3,57	0,76
<i>DRB1*0102</i>	<i>TNF-308*G</i>	3	2,59	3	2,14	1
<i>DRB1*0301</i>	<i>TNF-308*A</i>	3	2,59	4	2,86	1
<i>DRB1*0301</i>	<i>TNF-308*G</i>	5	4,31	5	3,57	0,76
<i>DRB1*0401</i>	<i>TNF-308*G</i>	2	1,72	1	0,71	0,593
<i>DRB1*0402</i>	<i>TNF-308*G</i>	3	2,59	6	4,29	0,519
<i>DRB1*0404</i>	<i>TNF-308*G</i>	1	0,86	3	2,14	0,632
<i>DRB1*0405</i>	<i>TNF-308*G</i>	2	1,72	4	2,86	0,693
<i>DRB1*0701</i>	<i>TNF-308*G</i>	11	9,48	15	10,71	0,833
<i>DRB1*0801</i>	<i>TNF-308*G</i>	2	1,72	3	2,14	1
<i>DRB1*0802</i>	<i>TNF-308*G</i>	2	1,72	2	1,43	1
<i>DRB1*0901</i>	<i>TNF-308*G</i>	-	0,00	4	2,86	0,13
<i>DRB1*1001</i>	<i>TNF-308*G</i>	1	0,86	3	2,14	0,628
<i>DRB1*1101</i>	<i>TNF-308*G</i>	8	6,90	16	11,43	0,275
<i>DRB1*1104</i>	<i>TNF-308*G</i>	6	5,17	1	0,71	0,051
<i>DRB1*1201</i>	<i>TNF-308*G</i>	4	3,45	6	4,29	1
<i>DRB1*1301</i>	<i>TNF-308*G</i>	10	8,62	11	7,86	0,824
<i>DRB1*1302</i>	<i>TNF-308*G</i>	5	4,31	2	1,43	0,242
<i>DRB1*1303</i>	<i>TNF-308*G</i>	1	0,86	3	2,14	0,632
<i>DRB1*1401</i>	<i>TNF-308*G</i>	4	3,45	6	4,29	1
<i>DRB1*1402</i>	<i>TNF-308*G</i>	1	0,86	3	2,14	0,624
<i>DRB1*1501</i>	<i>TNF-308*G</i>	5	4,31	7	5,00	1
<i>DRB1*1502</i>	<i>TNF-308*G</i>	3	2,59	1	0,71	0,326
<i>DRB1*1601</i>	<i>TNF-308*G</i>	3	2,59	3	2,14	1
<i>DRB1*1602</i>	<i>TNF-308*G</i>	1	0,86	3	2,14	0,632

p= valor de p

A distribuição dos haplótipos considerando-se os grupos alélicos de *HLA-DRB1* e *TNF* (-308 G>A), entre pacientes com RSA e mulheres-controle, foi comparada, e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as mesmas (Tabela 19).

TABELA 19 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS *HLA-DRB1* (GRUPO ALÉLICO)/*TNF* (-308 G>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E MULHERES-CONTROLE (N=70)

Haplótipo		Pacientes (N=58)		Controles (N=70)		<i>p</i>
		n	%	n	%	
<i>DRB1*01</i>	<i>TNF-308*A</i>	6	5,17	1	0,71	0,051
<i>DRB1*01</i>	<i>TNF-308*G</i>	8	6,90	9	6,43	1
<i>DRB1*03</i>	<i>TNF-308*A</i>	3	2,59	4	2,86	1
<i>DRB1*03</i>	<i>TNF-308*G</i>	5	4,31	5	3,57	0,761
<i>DRB1*04</i>	<i>TNF-308*A</i>	2	1,72	1	0,71	0,592
<i>DRB1*04</i>	<i>TNF-308*G</i>	12	10,34	17	12,14	0,697
<i>DRB1*07</i>	<i>TNF-308*A</i>	0	0,00	1	0,71	-
<i>DRB1*07</i>	<i>TNF-308*G</i>	11	9,48	15	10,71	0,839
<i>DRB1*08</i>	<i>TNF-308*A</i>	1	0,86	3	2,14	0,627
<i>DRB1*08</i>	<i>TNF-308*G</i>	7	6,03	6	4,29	0,586
<i>DRB1*09</i>	<i>TNF-308*G</i>	-	0,00	4	2,86	0,126
<i>DRB1*10</i>	<i>TNF-308*A</i>	0	0,00	1	0,71	-
<i>DRB1*10</i>	<i>TNF-308*G</i>	1	0,86	3	2,14	0,628
<i>DRB1*11</i>	<i>TNF-308*A</i>	1	0,86	0	0,00	0,452
<i>DRB1*11</i>	<i>TNF-308*G</i>	16	13,79	19	13,57	1
<i>DRB1*12</i>	<i>TNF-308*A</i>	0	0,00	2	1,43	0,507
<i>DRB1*12</i>	<i>TNF-308*G</i>	4	3,45	6	4,29	1
<i>DRB1*13</i>	<i>TNF-308*A</i>	0	0,00	2	1,43	0,507
<i>DRB1*13</i>	<i>TNF-308*G</i>	17	14,66	16	11,43	0,452
<i>DRB1*14</i>	<i>TNF-308*A</i>	1	0,86	0	0,00	-
<i>DRB1*14</i>	<i>TNF-308*G</i>	6	5,17	10	7,14	0,609
<i>DRB1*15</i>	<i>TNF-308*A</i>	2	1,72	0	0,00	0,202
<i>DRB1*15</i>	<i>TNF-308*G</i>	9	7,76	9	6,43	0,810
<i>DRB1*16</i>	<i>TNF-308*G</i>	4	3,45	6	4,29	1

p=valor de *p*

6.4.4 Frequências Alélicas de *HLA-DRB1* E *IFNG* (+874 T>A) em Pacientes Com RSA e Mulheres-Controle

A análise combinada da distribuição dos portadores das variantes alélicas de *HLA-DRB1* e *IFNG* (+874 T>A) com frequência superior a 1% entre pacientes com RSA e mulheres-controle foi realizada, e foi encontrada distribuição similar entre as mesmas (Tabela 20).

TABELA 20 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS (>0,01) DOS PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DE *HLA-DRB1* E *IFNG* (+874 T>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E MULHERES-CONTROLE (N=70)

Alelos		Pacientes (N=58)		Controles (N=70)		p
		n	%	n	%	
<i>DRB1*0101</i>	<i>INFG+874*A</i>	7	6,03	5	3,57	0,377
<i>DRB1*0101</i>	<i>INFG+874*T</i>	3	2,59	1	0,71	0,332
<i>DRB1*0102</i>	<i>INFG+874*A</i>	1	0,86	3	2,14	0,633
<i>DRB1*0301</i>	<i>INFG+874*A</i>	6	5,17	6	4,29	0,774
<i>DRB1*0301</i>	<i>INFG+874*T</i>	2	1,72	3	2,14	1
<i>DRB1*0402</i>	<i>INFG+874*A</i>	1	0,86	3	2,14	0,63
<i>DRB1*0402</i>	<i>INFG+874*T</i>	2	1,72	3	2,14	1
<i>DRB1*0404</i>	<i>INFG+874*A</i>	3	2,59	2	1,43	0,662
<i>DRB1*0405</i>	<i>INFG+874*A</i>	1	0,86	4	2,86	0,385
<i>DRB1*0701</i>	<i>INFG+874*A</i>	9	7,76	10	7,14	1
<i>DRB1*0701</i>	<i>INFG+874*T</i>	2	1,72	6	4,29	0,302
<i>DRB1*0802</i>	<i>INFG+874*T</i>	2	1,72	3	2,14	1
<i>DRB1*0901</i>	<i>INFG+874*A</i>	-	0,00	4	2,86	0,125
<i>DRB1*1101</i>	<i>INFG+874*A</i>	6	5,17	13	9,29	0,232
<i>DRB1*1101</i>	<i>INFG+874*T</i>	2	1,72	3	2,14	1
<i>DRB1*1201</i>	<i>INFG+874*A</i>	3	2,59	6	4,29	0,524
<i>DRB1*1301</i>	<i>INFG+874*A</i>	2	1,72	4	2,86	0,698
<i>DRB1*1301</i>	<i>INFG+874*T</i>	8	6,90	9	6,43	1
<i>DRB1*1302</i>	<i>INFG+874*T</i>	5	4,31	2	1,43	0,247
<i>DRB1*1303</i>	<i>INFG+874*T</i>	1	0,86	3	2,14	0,629
<i>DRB1*1401</i>	<i>INFG+874*A</i>	1	0,86	4	2,86	0,379
<i>DRB1*1401</i>	<i>INFG+874*T</i>	4	3,45	2	1,43	0,411
<i>DRB1*1501</i>	<i>INFG+874*T</i>	7	6,03	5	3,57	0,393
<i>DRB1*1601</i>	<i>INFG+874*A</i>	3	2,59	3	2,14	1

ρ =valor de p

A distribuição de portadores de grupos alélicos de *HLA-DRB1* e alelos de *IFNG* (+874 T>A) foi comparada entre pacientes com RSA e mulheres-controle, e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as mesmas (Tabela 21).

TABELA 21 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS PORTADORES DE GRUPOS ALÉLICOS DE *HLA-DRB1* E ALELOS DE *IFNG* (+874 T>A) ENTRE PACIENTES COM RSA (N=58) E MULHERES-CONTROLE (N=70)

Grupo alélico	Alelo	Pacientes (N=58)		Controles (N=70)		p
		n	%	n	%	
<i>DRB1*01</i>	<i>INFG+874*T</i>	5	4,31	6	4,29	1
<i>DRB1*01</i>	<i>INFG+874*A</i>	9	7,76	4	2,86	0,094
<i>DRB1*03</i>	<i>INFG+874*A</i>	6	5,17	6	4,29	0,771
<i>DRB1*03</i>	<i>INFG+874*T</i>	2	1,72	3	2,14	1
<i>DRB1*04</i>	<i>INFG+874*A</i>	10	8,62	12	8,57	1
<i>DRB1*04</i>	<i>INFG+874*T</i>	4	3,45	6	4,29	1
<i>DRB1*07</i>	<i>INFG+874*A</i>	9	7,76	10	7,14	1
<i>DRB1*07</i>	<i>INFG+874*T</i>	2	1,72	6	4,29	0,298
<i>DRB1*08</i>	<i>INFG+874*A</i>	1	0,86	3	2,14	0,628
<i>DRB1*08</i>	<i>INFG+874*T</i>	7	6,03	6	4,29	0,581
<i>DRB1*09</i>	<i>INFG+874*A</i>	0	0,00	4	2,86	0,126
<i>DRB1*10</i>	<i>INFG+874*A</i>	1	0,86	2	1,43	-
<i>DRB1*10</i>	<i>INFG+874*T</i>	0	0,00	2	1,43	-
<i>DRB1*11</i>	<i>INFG+874*A</i>	13	11,21	15	10,71	1
<i>DRB1*11</i>	<i>INFG+874*T</i>	4	3,45	4	2,86	1
<i>DRB1*12</i>	<i>INFG+874*A</i>	3	2,59	6	4,29	0,513
<i>DRB1*12</i>	<i>INFG+874*T</i>	1	0,86	2	1,43	-
<i>DRB1*13</i>	<i>INFG+874*A</i>	3	2,59	4	2,86	1
<i>DRB1*13</i>	<i>INFG+874*T</i>	14	12,07	14	10,00	0,687
<i>DRB1*14</i>	<i>INFG+874*A</i>	2	1,72	8	5,71	0,117
<i>DRB1*14</i>	<i>INFG+874*T</i>	5	4,31	2	1,43	0,245
<i>DRB1*15</i>	<i>INFG+874*A</i>	2	1,72	2	1,43	1
<i>DRB1*15</i>	<i>INFG+874*T</i>	9	7,76	7	5,00	0,438
<i>DRB1*16</i>	<i>INFG+874*A</i>	4	3,45	5	3,57	1
<i>DRB1*16</i>	<i>INFG+874*T</i>	0	0,00	1	0,71	-

p=valor de p

7 DISCUSSÃO

Este estudo caso-controle investigou a variação genética presente nos genes *IL10*, *TNF*, *IFNG*, *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1* e sua relação com o abortamento espontâneo recorrente.

As tentativas de se explicar o enigma da sobrevivência fetal são tão antigas quanto a própria imunogenética. A Imunologia da Reprodução tornou-se uma nova área de estudo que se originou da Imunologia dos Transplantes. Os investigadores partiam da premissa de que o feto poderia ser considerado um alo-enxerto e se submeteria às leis de rejeição ou compatibilidade. Hoje, métodos imunológicos de investigação mais sofisticados têm sido utilizados, buscando definir com maior clareza os mecanismos de imunorregulação em uma gravidez normal ou em uma gravidez que termina em aborto.

Entre os problemas que afetam a gravidez está o RSA idiopático que ocorre freqüentemente durante o primeiro trimestre. Esse é o período no qual a placenta é formada, e o abortamento pode ocorrer como consequência do desenvolvimento anormal da unidade feto placentária.

Os abortos espontâneos podem resultar de diferentes causas: anormalidades cromossômicas presentes no embrião e/ou nos pais, disfunções hormonais, alterações anatômicas, doenças auto-imunes e infecções no trato reprodutivo materno. No entanto, todas essas causas respondem por cerca de 60% das perdas gestacionais recorrentes em populações humanas. É provável que cerca da metade das restantes, possa ser atribuída a causas imunes e/ou genéticas ainda não-elucidadas (COULAM, 1986; COULAM e STERN, 1994). Vários fatores relacionados ao sistema imune podem se somar levando ao RSA idiopático, incluindo o reconhecimento de antígenos paternos presentes na unidade fetoplacentária pelo sistema imune materno, seguido pela destruição do feto, embora as evidências para isso sejam limitadas. Há um tráfego bidirecional de células e ácidos nucleicos entre mãe e feto. No terceiro trimestre da gravidez 100% de amostras de plasma materno apresentam DNA fetal (BIANCHI e ROMERO, 2003).

7.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DE *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) E *IFNG* (+874 T>A) NAS AMOSTRAS DE MULHERES-PACIENTES COM RSA E NAS MULHERES-CONTROLE

Variações genéticas nos genes que codificam citocinas são significativamente diferentes entre populações (COX et al., 2001; MEENAGH et al., 2002; HOFFMANN et al., 2002).

Na investigação dos polimorfismos genéticos de *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) não foram observadas diferenças relativas à distribuição da variação genética nesses genes quando se comparou mulheres-pacientes com RSA (N=61) e mulheres-controle (N=75).

Estes resultados são coincidentes com os dados de uma pesquisa realizada na Finlândia por KARHUKORPI et al. (2001) que não encontraram diferenças com relação às frequências alélicas de *IL10**-1082G e *IL10**-1082A entre 38 mulheres caucasóides com RSA e 131 mulheres-controle pareadas etnicamente. Estes resultados também são coincidentes com os dados de BABBAGE et al. (2001) que, no Reino Unido, investigaram o polimorfismo dos genes *TNF* (-308 G>A), *IL10* (-1082 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) em 43 mulheres com RSA e 73 controles caucasóides, e também não encontraram diferenças com relação à distribuição das frequências alélicas entre pacientes e controles. Estes resultados também são coincidentes com resultados encontrados por PIETROWSKI et al. (2004), na Áustria, que analisaram dois polimorfismos do gene *TNF* (-308 G>A e -863 C>A) em 168 mulheres caucasóides com RSA e em 212 mulheres-controle, e não encontraram associação entre esses polimorfismos e o RSA.

Há resultados conflitantes entre estes resultados e aqueles obtidos por DAHER et al. (2003), PRIGOSHIN et al. (2004) e KAMALI-SARVESTANI et al. (2005). DAHER et al. (2003), no Brasil, investigaram o polimorfismo dos genes *TNF*, *IL10* e *IFNG* em 48 mulheres com RSA e 108 controles caucasóides, obtendo os seguintes resultados: associação significativa com o genótipo relacionado a alto produtor de INF- γ (+874 TT, OR=1,92 $p=0,04$) e IL-10 (-1082 GG, OR=1,75, $p=0,03$), e uma tendência para associação com os genótipos alto-produtores de TNF- α (-308 AA a AG, OR=1,61, $p=0,18$). PRIGOSHIN et al.

(2004), na Argentina, também com relação aos mesmos polimorfismos, em 41 mulheres com RSA e 54 mulheres controle, obtiveram os seguintes resultados: (1) não há evidência de associação com *TNFA* e *IL10* (2) associação significativa entre RSA versus controles no que concerne a *IFNG* (+874 T>A): o genótipo TA estava aumentado em pacientes em comparação com o grupo controle (65% versus 35,8%, $p=0,01$) e havia uma diminuição estatisticamente significativa na frequência do genótipo AA (baixo-produtor) entre o grupo de pacientes em comparação com o grupo controle (20% versus 42,5%, $p=0,04$). KAMALI-SARVESTANI et al. (2005), no Irã, também investigaram polimorfismos relacionados aos genes *TNF* (-308 G>A), *IFNG* (+874 T>A) e *IL10* (-592 C>A, -819 C>T e -1082 G>A) em 139 pacientes com RSA e 143 mulheres-controle, e os resultados indicaram associação positiva significativa entre o genótipo CC de *IL10* (-592 C>A) (63% nas pacientes e 46% nas mulheres-controle; OR=0,51, IC 95% [0,3-0,85]; $p<0,01$) e RSA.

Os dados conflitantes, encontrados na literatura, relacionados ao RSA poderiam ser explicados em decorrência do não-pareamento entre controles e pacientes o que poderia levar à associações espúrias. Há, ainda, uma propensão a publicar somente resultados positivos relacionados a estudos de associação.

Os dados conflitantes ainda poderiam ser explicados pelo fato de as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos estarem associadas à composição étnica da população. Polimorfismos relacionados aos genes codificantes das citocinas mostram diferenças significativas entre diferentes populações (COX et al., 2001; MEENAGH et al., 2002; HOFFMANN et al., 2002). Há relatos, na literatura, sobre diferenças individuais na produção dessas citocinas, interpretadas como diferenças herdáveis e dependentes do genótipo (HUTCHINSON et al., 1999).

Níveis diferenciais na produção de citocinas como alto, intermediário e baixo podem ser inferidos de acordo com o genótipo do indivíduo (PERREY et al. 1998,1999). No entanto, pouco se conhece sobre o impacto da variação genética e as reais implicações desse polimorfismo genético dos genes investigados no presente trabalho sobre a produção de citocinas. Além do mais, seus produtos gênicos (citocinas) interagem numa rede intrincada de fenômenos imunológicos com mecanismos de regulação também muito complexos e são capazes de

mediar uma ampla gama de interações imunes e do desenvolvimento, mas sua função biológica não está totalmente elucidada. O que se conhece é que várias citocinas apresentam similaridade de atuação, o que poderia compensar o efeito de uma mutação associada com fenótipos baixo/alto produtor de uma delas. Conforme argumentado por HUTCHINSON et al. (1999) a resposta imune varia de um indivíduo para outro, e a produção de citocinas está parcialmente sujeita ao controle genético.

A identificação de genótipos e seus respectivos fenótipos de produção (alto, intermediário e baixo) podem contribuir e ser de grande importância para o entendimento do sucesso de uma gestação, uma vez que as evidências clínicas sugerem que uma expressão exacerbada de citocinas pró-inflamatórias está associada com perdas gestacionais.

Existindo um polimorfismo funcional associado a certas citocinas, é de se pensar que mulheres com abortos recorrentes espontâneos apresentem uma predisposição genética para uma expressão aumentada dessas citocinas (REID et al., 2001). Este estudo não teve o objetivo de investigar esse aspecto e sim, se a variação genética presente nos genes *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) está associada ao prognóstico gestacional.

7.2 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS $TNF-\alpha$ e $INF-\gamma$

A análise combinada de polimorfismos nos genes *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) foi realizada com a finalidade de verificar se uma possível interação sinérgica entre os mesmos poderia estar associada com distúrbios gestacionais. Os resultados permitiram concluir que não há evidências de que ambos estejam interagindo ou mesmo atuando com efeito aditivo no que se refere à predisposição ao RSA.

7.3 GENES *HLA-DQB1* E *HLA-DRB1*

7.3.1 Alelos /Genótipos *HLA-DQB1* e RSA

No presente trabalho, os alelos do *locus HLA-DQB1* de 59 pacientes com RSA e 73 controles foram tipificados, e as frequências genotípicas desse *locus* se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os resultados da análise entre genótipos, considerando-se os grupos alélicos, permitiu concluir que indivíduos *HLA-DQB1*02/HLA-DQB1*03* (heterozigotos) são mais frequentes no grupo controle (21%) quando comparados com o grupo paciente (5%) ($p=0,011$ OR= 0,21 [0,06 – 0,75] com um índice de confiança de 95%) (Tabela 9), sugestivo de que esse genótipo possa conferir proteção ao RSA. No entanto, a análise dos resultados ao nível alélico sugere que o efeito protetor que, na análise anterior se mostrou associado ao genótipo *HLA-DQB1*02 / HLA-DQB1*03*, na realidade poderia ser atribuído à combinação genotípica *HLA-DQB1*0202/HLA-DQB1*0301* (Tabela 8) que seriam os fatores determinantes de proteção ao RSA.

A tolerância imunológica ao trofoblasto é geralmente crítica para o sucesso da gravidez. Antígenos particulares do trofoblasto podem induzir uma resposta imune materna que é benéfica, levando à produção de anticorpos bloqueadores e mediadores da resposta imune (citocinas) com a conseqüente indução de padrões Th1 ou Th2.

Entre as causas que levam ao abortamento recorrente, o dano dos tecidos embrionários (como o sinciotrofoblasto) mediado por mecanismos aloimunes foi proposto e pode-se supor que moléculas HLA de classe II maternas estejam envolvidas (CHRISTIANSEN et al., 1996). O mecanismo pelo qual moléculas HLA de classe II conferem suscetibilidade ao RSA pode ocorrer mediante a predisposição à hipersecreção de citocinas embriotóxicas como TNF- α , IFN- γ e LT- α , especialmente as duas últimas, cuja hipersecreção, *in vitro*, é ativada em linfócitos de mulheres férteis normais pelos linfócitos de mulheres suscetíveis a RSA (CHRISTIANSEN, 1999; HILL, POLGAR y ANDERSON, 1995; YAMADA, POLGAR y HILL, 1994). Há evidências de que existe uma interação bidirecional

entre o sistema imune materno e o aparato reprodutivo durante a gravidez, e o sistema imune materno tanto pode estimular como inibir a unidade fetoplacentária (WEGMANN et al. 1993). As respostas dos linfócitos Th aos antígenos solúveis são restritas a indivíduos que possuem certas moléculas HLA-DR e –DQ. Por esse mecanismo, moléculas HLA-DR e –DQ apresentam associação com uma série de doenças auto-imunes (TODD et al., 1988). Muitos casos de RSA poderiam ser conseqüência de uma resposta prejudicial das células Th restritas a moléculas HLA de classe II contra um ou muitos antígenos do trofoblasto (CHRISTIANSEN et al., 1999) uma condição semelhante a uma doença auto-imune órgão-específico (BACH, 1995).

Para que ocorra a implantação, de acordo com a hipótese de Wegmann, há necessidade da presença de uma reação imunológica, cujo ponto central pode ser o reconhecimento de antígenos paternos (aloantígenos) que elicitaria uma resposta imune por parte do sistema imune materno. Tal reconhecimento envolveria a apresentação de antígenos paternos (como HLA-G) por parte de células apresentadoras de antígenos maternas presentes na interface materno-(fetal), onde os epítomos se encaixariam com maior ou menor afinidade. O efeito protetor de *HLA-DQB1*02(02)* juntamente com o alelo *HLA-DQB1*03(01)* poderia estar relacionado ao efeito aditivo desses alelos em apresentar epítomos paterno-derivados levando a uma resposta protetora contra o abortamento recorrente.

Outros pesquisadores também encontraram associação entre alelos *HLA-DQB1* e o RSA como Wang et al. (2004), cujos estudos realizados em amostra de mulheres chinesas mostraram que a freqüência dos alelos *HLA-DQB1*0604/*0605* em pacientes com RSA estava significativamente aumentada nas pacientes ($p=0,0128$ e Risco Relativo = 5), enquanto a freqüência dos alelos *HLA-DQB1*0501/0502* estava significativamente diminuída entre as pacientes com RSA ($p= 0,0426$ e Risco Relativo= 0,26) quando comparadas às mulheres-controle.

Diferentes populações podem apresentar diferentes alelos associados com uma mesma patologia como no caso do RSA idiopático, pois os polimorfismos genéticos são significativamente diferentes entre as diferentes populações.

7.3.2 Alelos/Genótipos *HLA-DRB1* e RSA

Os alelos do locus *HLA-DRB1* de 59 pacientes com RSA e 72 controles foram tipificados, e as frequências genóticas deste locus se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não houve diferença estatística quando se compararam as frequências, considerando os grupos alélicos entre pacientes e controles, mas a comparação das frequências alélicas entre pacientes e controles demonstrou diferença no que se refere ao alelo *HLA-DRB1*1104*, o qual está presente em 6% das pacientes e em 1% dos controles ($p=0,045$). O valor do *Odds Ratio* é de 6,76 (0,67-57,71) com índice de confiança de 95%, indicando uma frequência ligeiramente aumentada do referido alelo entre as pacientes (Tabela 10). No entanto, esse resultado é inconclusivo, provavelmente devido ao tamanho da amostra e deve ser analisado em estudo mais abrangente.

Considerando o papel biológico desempenhado pelas moléculas HLA, poderíamos hipotetizar que as moléculas *HLA-DRB1*1104*, presentes nas células apresentadoras de antígenos (APCs) maternas, poderiam ser ineficazes na apresentação de epítomos paterno-derivados aos linfócitos Th, não estimulando, portanto, uma resposta imune benéfica à implantação, dependente de anticorpos bloqueadores, entre outros componentes relacionados à resposta imune adaptativa.

Ou, pelo contrário, a molécula *HLA-DRB1*1104* seria mais eficaz na indução de uma resposta exacerbada contra antígenos paterno-derivados que seria deletéria, desviando, por exemplo, o balanço Th1/Th2 para Th1.

Outros pesquisadores descreveram associações diferentes entre RSA e alelos HLA. Através de métodos sorológicos, TAKAMIZAWA et al. (1987) encontraram uma frequência aumentada de alelos *HLA-DR1* e *-DRw8* em mulheres japonesas com RSA, mas sem significado estatístico. Posteriormente, SASAKI et al. (1997) usando o método PCR-SSP, observaram aumento significativo na frequência de alelos *HLA-DR4* em mulheres japonesas com RSA. CHRISTIANSEN et al. (1994, 1996, 1999) relataram que marcadores genéticos maternos *HLA-DR1*, *-DR3* e *-DR10* poderiam estar envolvidos no abortamento espontâneo em população dinamarquesa. CHRISTIANSEN et al. (1998) encontraram associação entre alelos *HLA-DR3* em pacientes com RSA que

apresentavam anticorpos antinucleares e anticorpos anticardiolipina. No Japão, TAKAKUWA et al. (2003), através da técnica PCR-RFLP, encontraram a frequência de *HLA-DRB1*1502* aumentada em pacientes com relação a controles, mas a diferença não foi significativa após correção. KRUSE et al. (2004), em uma meta-análise, confirmaram a influência do alelo *HLA-DR*03* ou alelos de outros genes em desequilíbrio de ligação no RSA em mulheres com abortamento primário e secundário, nas quais havia a presença de auto-anticorpos anticardiolipina e antinucleares.

Os resultados, aparentemente conflitantes, poderiam ser explicados pelo fato de que frequências alélicas e genótípicas relacionadas aos polimorfismos genéticos são significativamente diferentes entre populações e ainda pelo fato de as amostras analisadas apresentarem um componente imunológico distinto como a presença de auto-anticorpos séricos nas pacientes com RSA, o que não ocorreu na nossa pesquisa, que se restringiu àquelas pacientes com RSA de causa desconhecida.

7.3.3 Interações Gênicas Entre *HLA-DRB1* e *HLA-DQB1*, *IL10* (-1082 G>A, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) no RSA

O RSA idiopático é certamente uma condição complexa e relacionada a muitos genes (multifatorial). Vários produtos gênicos, incluindo o HLA, provavelmente, atuam nesse contexto fazendo parte de uma rede intrincada de interações que incluem genes codificantes de citocinas e outros componentes da resposta imune.

Com o objetivo de verificar a ocorrência de uma possível interação gênica entre *HLA-DRB1* e *HLA-DQB1*, *IL10* (-1082 G>A, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) no RSA, foram realizadas as análises comparando-se a distribuição dos haplótipos *HLA-DRB1/HLA-DQB1* entre pacientes e controles, bem como a distribuição dos genótipos *HLA-DRB1* e *IL10* (-1082 G>A, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A) e não foram detectadas quaisquer associações que pudessem ser sugestivas de interações entre os citados genes e sua conseqüente relação com o RSA.

8 CONCLUSÕES

- ✓ Não foi observada associação entre variantes alélicas e genotípicas de *IL10* (-1082 G>A, -819 C>T, -592 C>A), *TNF* (-308 G>A) e *IFNG* (+874 T>A), individualmente ou combinadas, sugerindo que estas não influenciam na predisposição ou proteção ao RSA.
- ✓ Foi identificada uma associação positiva entre *HLA-DRB1*1104* e o RSA o que sugere que este alelo é um fator genético de predisposição ou, que está em desequilíbrio de ligação com o verdadeiro alelo de suscetibilidade.
- ✓ Foi detectada uma associação negativa com o genótipo *HLA-DQB1*02 / HLA-DQB1*03* e o RSA, o que sugere um efeito protetor deste genótipo.
- ✓ Não foi observada associação com o RSA na análise dos haplótipos constituídos de variantes alélicas de *HLA-DRB1* e de *HLA-DQB1*, bem como de variantes alélicas de *HLA-DRB1* e de *TNF* (-308 G>A).
- ✓ Não foi observada associação com o RSA a partir da análise de combinações de variantes alélicas de *HLA-DRB1* e *IL-10* (-1082 G>A, -592 C>A), bem como da combinação de variantes alélicas de *HLA-DRB1* e de *IFNG* (+874 T>A).

Em função do importante papel biológico e clínico do Sistema HLA, bem como dos genes que codificam moléculas imunomoduladoras da resposta imune, incluindo as citocinas, o papel desempenhado por essas moléculas permanece, ainda, no campo das especulações e estudos multicêntricos, envolvendo um número maior de indivíduos, poderão contribuir para elucidar a participação desses genes nos RSAs.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 486p.

ABED, N.S.; CHACE, J.H.; COWDERY, J.S. T cell-independent and T cell-dependent B cell activation increases IFN- γ R expression and renders B cells sensitive to IFN- γ -mediated inhibition. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.153, n.8, p.3369-3377, 1994.

ANDO, S.; OHTA, T.; TANIMOTO, T.; SANO, O.; YAMAUCHI, H.; ANDOH, O.; TORIGOE, K.; KURIMOTO, M. Natural human interferon- γ derived from lipopolysaccharide-stimulated human myelomonocytic HBL-38 cells. **Japanese Journal of Cancer Research**, Bunkyo-Ku, v.79, n.6, p.757-765, 1988.

ANDREWS, J.S.; BERGER, A .E.; WARE, C.F. Characterization of the receptor for tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) on human T lymphocytes. TNF and LT differ in their receptor binding properties and induction of MHC class I proteins on a human CD40+ T cell hybridoma. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.144, n.7, p.2582-2591, 1990.

ANSARI, A.H.; KIRKPATRICK, B. Recurrent pregnancy loss. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v.43, n.9, p.806-814, 1998.

APLIN, J.D. The cell biology of human implantation. **Placenta**, London, v.17, n.5/6, p.269-277, 1996.

ARCK, P.A.; FERRICK, D.A.; STEELE-NORWOOD, D.; CROITORU, K.; CLARK, D.A . Murine T cell determination of pregnancy outcome. I) Effects of strain, alpha-beta T cell receptor, gamma-delta T cell receptor, and gamma-delta T cell subsets. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v.36, n.6, p.492-501, 1997.

ARCK, P.C.; FERRICK, D.A.; STEELE-NORWOOD, D.; EGAN, P.J.; CROITORU, K.; CARDING, S.R.; DIETL, J.; CLARK, D.A . Murine T cell determination of pregnancy outcome. II. Distinct Th1 and Th2/3 populations of V gamma 1(+) delta 6(+) T cells influence success and failure of pregnancy in CBA/JxDBA/2J matings. **Cellular Immunology**, Orlando, v.196, p.71-79, 1999.

ARPS, V.; KOLSCH, E. The role of interleukin-10 in the generation of CD4+ and CD8+ memory T cells (expressing a CD44+, CD62L- phenotype) and their contribution to the regulation of immunoglobulin E antibody formation. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.127, n.3, p.198-207, 2002.

ASANO, H.; KOBAYASHI, T.; UCHIDA, K.; HAYASHI, S.; YOKOYAMA, I.; INOKO, H.; TAKAGI, H. Significance of tumor necrosis factor microsatellite polymorphism in renal transplantation. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.50, p.484-488, 1997.

ATHANASSAKIS, I.; BLEACKLEY, R.C.; PAETKAU, V.; GUILBERT, L.; BARR, P.J.; WEGMANN, T.G. The immunostimulatory effect of T cells and T cell lymphokines on murine fetally derived placental cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.138, n.1, p.37-44, 1987.

BABBAGE, S.J.; ARKWRIGHT, P.D.; VINCE, G.S.; PERREY, C.; PRAVICA, V.; SIOBHAN, Q.; BATES M.; HUTCHINSON, I.V. Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v.51, n.1, p.21-27, 2001.

BACH J.F. Organ-specific autoimmunity. **Immunology Today**, Amsterdam, v.16, n.7, p.353-355, 1995.

BACH, E.A.; AGUET, M.; SCHREIBER, R.D. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.15, p.563-591, 1997.

BAINES, M.; DE FOUGEROLLES, R. Modulation of Natural Killer activity influences resorption rates in CBA X DBA/2 matings. The **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon v.11, n.2, p.147-153, 1988.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y.J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.18, p.767-811, 2000.

BARBARA, J.A.J.; VAN OSTADE, X.; LOPEZ, A.F. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α): the good, the bad and potentially very effective. **Immunology and Cell Biology**, Carlton, v.74, p.434-443, 1996.

BASHAM, T.Y.; MERIGAN, T.C. Recombinant interferon- γ increases HLA-DR synthesis and expression. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.130, n.4, p.1492-1494, 1983.

BATTAGLIA, M.; STABILINI, A.; DRAGHICI, E.; GREGORI, S.; MOCCHETTI, C.; BONIFACIO, E.; RONCAROLO, M.G. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. **Diabetes**, New York, v.55, n.1, p.40-49, 2006.

BEER, A.E.; BILLINGHAM, R.E. Histocompatibility gene polymorphisms and maternal-fetal interactions. **Transplantation Proceedings**, East Norwalk, v.9, n.2, p.1393-1401, 1977.

BEER, A.E.; SCOTT, J.R.; BILLINGHAM, R.E. Histoincompatibility and maternal immunological status as determinants of fetoplacental weight and litter size in rodents. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.142, n.1, p.180-196, 1975.

BELL, J.I.; DENNEY, D.; FOSTER, L.; BELT, T.; TODD, J.A.; McDEVITT, H.O. Allelic variation in the DR subregion of the human major histocompatibility complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.84, n.17, p.6234-6238, 1987.

BELL, S.C.; BILLINGTON, W.D. Major anti-paternal alloantibody induced by murine pregnancy is non-complement-fixing IgG1. **Nature**, London, v.288, n.5789, p.387-388, 1980.

BENDTZEN, K.; MORLING, N.; FOMSGAARD, A.; SVENSON, M.; JAKOBSEN, B.; ODUM, N.; SVEJGAARD, A. Association between HLA-DR2 and production of tumour necrosis factor α and interleukin 1 lipopolysaccharide. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v.28, p.599-606, 1988.

BENJAMIN, D.; HARTMANN, D.P.; BAZAR, L.S.; JACOBSON, R.J. Burkitt's cells can be triggered by teleocidin to secrete interferon-gamma. **American Journal of Hematology**, New York, v.22, n.2, p.169-177, 1986.

BERKMAN, N.; JOHN, M.; ROESEMS, G.; JOSE, P.J.; BARNES, P.J.; CHUNG, K.F. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 α expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.155, n.9, p.4412-4418, 1995.

BEUTLER, B.A.; MILSARK, I.W.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.135, n.6, p.3972-3977, 1985.

BIANCHI, D.T.; ROMERO, R. Biological implications of bi-directional fetomaternal cell traffic: a summary of a National Institute of Child Health and Human Development-sponsored conference. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, Boca Raton, v.14, n.2, p.123-129, 2003.

BRANCH, D.W.; DUDLEY, D.J.; SCOTT, J.R.; SILVER, R.M. Antiphospholipid antibodies and fetal loss. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.326, n.4, p.952-954, 1992.

BRIGHTBILL, H.D.; PLEVY, S.E.; MODLIN, R.L.; SMALE, S.T. A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.164, p.1940-1951, 2000.

BROWN, D.A.; KONDO, K.L.; WONG, S.W.; DIAMOND, D.J. Characterization of nuclear protein binding to the interferon- γ promoter in quiescent and activated human T cells. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.22, n.9, p.2419-2428, 1992.

BROWN, D.A.; NELSON, F.B.; REINHERZ, E.L.; DIAMOND, D.J. The human interferon-gamma gene contains an inducible promoter that can be transactivated by tax I and II. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.21, n.8, p.1879-1885, 1991.

BROWN, K.D.; ZURAWSKI, S.M.; MOSMANN, T.R.; ZURAWSKI, G. A family of small inducible proteins secreted by leucocytes are members of a new superfamily that includes leucocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.142, p.679-687, 1989.

BROWN, N.L.; ALVI, S.A.; ELDER, M.G.; BENNET, P.R. e SULLIVAN, M.H.F. The regulation of prostaglandin output from term intact fetal membranes by anti-inflammatory cytokines. **Immunology**, Oxford, v.99, p.124-133, 2000.

BROWNING, J.L.; NGAM-EK, A.; LAWTON, P.; DeMARINIS, J.; TIZARD, R.; PINGCHANG-CHOW, E.; HESSION, C.; O'BRINE-GRECO, B.; FOLEY, S.F.; WARE, C. F. Lymphotoxin β , a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. **Cell**, Cambridge, v.72, p.847-856, 1993.

BURDIN, N.; PERONNE, C.; BANCHEREAU, J.; ROUSSET, F. Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.177, n.2, p.295-304, 1993.

BYRNE, J.L.L. e WARD, K. Genetic factors in recurrent abortion. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.37, p.730-744, 1994.

CAPSONI, F.; MINONZIO, F.; ONGARI, A. M.; CARBONELLI, V.; GALLI, A.; ZANUSSI, C. IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.58, n.3, p.351-358, 1995.

CARP, H.J.A.; TADER, V.; MASHIACH, S. Recurrent miscarriage: A review of current concepts, immune mechanisms, and results of treatment. **Obstetrical & Gynecological Survey**, Baltimore, v. 45, p. 657-669, 1990.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.72, n.9, p.3666-3670, 1975.

CASSATELLA, M.A. ; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BERTAGNIN, A. ; LUSTER, A. D.; McDONALD, P.P. Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils, **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.27, p.11-115, 1997.

CASSATELLA, M.A.; MEDA, L.; BONORA, S.; CESKA, M.; CONSTANTIN, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.178, p.2207-2211, 1993.

CASSATELLA, M.A.; MEDA, L.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BONORA, S. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.179, p.1695-1699, 1994.

CAUCHI, M.N.; TAIT, B.; WILSHIRE, M.I.; KOH, S.H.; MRAZ, G.; KLOSS, M.; PEPPERELL, R. Histocompatibility antigens and habitual abortion. **American Journal of Reproductive Immunology e Microbiology**, New York, v.18, p.28-31, 1988.

CHAN, S.H.; KOBAYASHI, M.; SANTOLI, D. PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.148, n.1, p.92-98, 1992.

CHAN, S.H.; PERUSSIA, B.; GUPTA, J.W.; KOBAYASHI, M.; POSPISIL, M.; YOUNG, H.A. WOLF, S.F.; YOUNG, D.; CLARK, S.C.; TRINCHIERI, G. Induction of interferon- γ production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.173, n.4, p.869-879, 1991.

CHAOUAT, C.; ZOURBAS, S.; OSTOJIC, S.; LAPPREE-DELAGE, G.; DUBANCHET, S.; LEDEE, N.; MARTAL, J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v.53, p.241-256, 2002.

CHAOUAT, G.; ASSAL-MELIANI, A.; MARTAL, J.; RAGHUPATHY, R.; ELLIOT, J.; MOSMANN, T.; WEGMAN, T.G. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA (DBA/2) mating combination and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.154, p.4261-4268, 1995.

CHAOUAT, G.; LEDEE-BATAILLE, N.; CHEA, K.B.; DUBANCHET, S. Cytokines and implantation. **Chemical immunology and allergy**, New York, v.88, p.34-63, 2005.

CHAOUAT, G.; MENU, E.; CLARK, D.A.; DY, M.; MINKOWSKI, M.; WEGMANN, T.G. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.89, n.2, p.447-458, 1990.

CHAOUAT, G.; TRANCHOT-DIALLO, J.; VOLUMÉNIÉ, J.L.; MENU, E.; GRAS, G.; DELAGE, G.; MOGNETTI, B. Immune suppression and Th1/Th2 balance in pregnancy revisited: a (very) personal tribute to Tom Wegmann. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v.37, p.427-434, 1998.

CHARD, T. Cytokines in implantation. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.1, n.4, p.385-396, 1995.

CHERWINSKI, H.M.; SCHUMACHER, J.H.; BROWN, K.D.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between TH1 and TH2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.166, p.1229-1244, 1987.

CHOI, B.C.; POLGAR, K.; XIAO, L.; HILL, J.A. Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. **Human Reproduction**, Oxford, v.15, p.46-59, 2000.

CHRISTIANSEN, O.B.; PEDERSEN, B.; MATHIESEN, O.; HUSTH, M.; GRUNNET, N. Maternal class II alleles predispose to pregnancy losses in Danish women with recurrent spontaneous abortions and their female relatives. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v.33, p.239-244, 1996.

CHRISTIANSEN, O.B.; RASMUSSEN, K.L.; JERSILD, C.; GRUNNET, N. HLA class II alleles confer susceptibility to recurrent fetal losses in Danish women. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.44, p.225-233, 1994.

CHRISTIANSEN, O.B.; RIISOM, K.; LAURITSEN, J.G.; GRUNNET, N. No increased histocompatibility antigen sharing in couples with idiopathic habitual abortions. **Human Reproduction Update**, Oxford., v.4, p.160-162, 1989.

CHRISTIANSEN, O.B.; RING, M.; ROSGAARD, A.; GRUNNET, N.; GLUUD, C. Association between HLA-DR1 and -DR3 antigens and unexplained repeated miscarriage. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.5, p.249-255, 1999.

CICCARONE, V.C.; CHRIVIA, J.; HARDY, K.J.; YOUNG, H.A. Identification of enhancer-like elements in human IFN γ genomic DNA. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.144, n.2, p.725-730, 1990.

CIPPITELLI, M.; SICA, A.; VIGGIANO, V.; YE, J.; GHOSH, P.; BIRRER, M.J.; YOUNG, H.A. Negative transcriptional regulation of the interferon- γ promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.270, n.21, p.12548-12556, 1995.

CLARK, D.A.; CHAOUAT, G. What do we know about spontaneous abortion mechanisms? **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v.19, n.1, p.28-37, 1989.

COCKFIELD, S.M.; RAMASSAR, V.; NOUJAIM, J.; VAN DER MEIDE, P.H.; HALLORAN, P.F. Regulation of IFN- γ expression *in vivo*: IFN- γ up-regulates expression of its mRNA in normal and lipopolysaccharide-stimulated mice. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.150, n.3, p.717-725, 1993.

COFFMAN, R.L.; SEYMOUR, B.W.; LEBMAN, D. A.; HIRAKI, D.D.; CHRISTIANSEN, J.A.; SHADER, B.; CHERWINSKI, H.M.; SAVELKOUL, H.F.; FINKELMAN, F.D.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v.102, p.5-38, 1988.

COOK, J.K.; KARAKOZIS, S.; KIM, D.; PROVIDO, H.; GONGORA, E.; KIRKPATRICK, J.R. Interleukin-10 attenuates proinflammatory cytokine production and improves survival in lethal pancreatitis. **American Surgeon**, Baltimore, v.67, n.3, p.237-241, 2001.

COOKSON, S.; CONSTANTINI, P.K.; CLARE, M.; UNDERHILL, J.A.; BERNAL, W.; CZAJA, A.J.; DONALDSON, P.T. Frequency and Nature of Cytokine Gene Polymorphisms in Type 1 Autoimmune Hepatitis. **Hepatology**, Philadelphia, v.30, n.4, p.851-856, 1999.

COULAM, C.B. Immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. **Early Pregnancy**, n.1, v.1, p.13-26, 1995.

COULAM, C.B. Unexplained recurrent pregnancy loss: Epilogue. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Hagerstown, v.29, p.999-1004, 1986.

COULAM, C.B.; STERN, J.J. Endocrine factors associated with recurrent spontaneous abortion. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Hagerstown, v.37, p.730-744, 1994.

COULAN, C.B.; MOORE, S.B.; O'FALLON, W.M. Association between major histocompatibility antigen and reproductive performance. **American Journal of Reproductive Immunology e Microbiology**, New York, v.14, p.54-58, 1987.

COX, E.D.; HOFFMANN, S.C.; Di MERCURIO, B.S.; WESLEY, R.A.; HARLAN, D.M.; KIRK, A.D.; BLAIR, P.J. Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. **Transplantation**, Baltimore, v.72, n.4, p.720-726, 2001.

CRAWLEY, E.; KAY, R.; SILLIBOURNE, J.; PATEL, P.; HUTCHINSON, I.; WOO, P. Polymorphic haplotypes of the Interleukin-10 5' flanking region determine variable Interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of Juvenile Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, Hagerstown, v.42, n.6, p.1101-1108, 1999.

DAHER, S.; FONSECA, F.; RIBEIRO, O. G.; MUSATTI, C. C.; GERBASE – DeLIMA, M. Tumor necrosis factor during pregnancy and at the onset of labor and spontaneous abortion. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, Shannon, v.83, p.77-79, 1999.

DAHER, S.; SHULZHENKO, N.; MORGUN, A .; MATTAR, R.; RAMPIM, G.F.; CAMANO, L.; DeLIMA, M.G. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v.58, n.1, p.69-77, 2003.

DARMOCHWAL-KOLARZ, D.; LESZCZYNSKA-GORZELAK, B.; ROLINSKI, J.; OLESZCZUK, J. T helper 1- and T helper 2-type cytokine imbalance in pregnant women with pre-eclampsia. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, Shannon, v.86, p.165-170, 1999.

DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C.G.; DE VRIES, J.E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.174, n.5, p.1209-1220, 1991a

DE WAAL MALEFYT, R.; HAANEN, J.; SPITS, H.; RONCAROLO, M.G.; TE VELDE, A.; FIGDOR, C.; JOHNSON, K.; KASTELEIN, R.; YSSEL, H.; DE VRIES, J.E. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.174, n.4, p.915-924, 1991.b

DEL PRETE, G.F.; DE CARLI, M.; MASTROMAURO, C.; BIAGIOTTI, R.; MACCHIA, D.; FALAGIANI, P.; RICCI, M.; ROMAGNANI, S. Purified protein derivative (PPD) of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) (TES) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profiles of cytokine production. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.88, p.346-350, 1991.

DENEYS, V. e DeBRUYERE, M. Immunological tolerance of the fetal allograft: efficacy of immunotherapy and IL-4 and TNF- α serum levels in recurrent abortion. **Transplantation Proceedings**, East Norwalk, v. 9, p.2467-2469, 1997.

DERYNCK, R.; LEUNG, D.W.; GRAY, P.W., GOEDDEL, D.V. Human interferon gamma is encoded by a single class of mRNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.10, n.12, p.3605-3615, 1982.

DEVOS, R.; CHEROUTRE, H.; TAYA, Y.; DEGRAVE, W.; VAN HEUVERSWYN, H.; FIERS, W. Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.10, n.8, p.2487-2501, 1982.

DI MARZIO, P.; PUDDU, P.; CONTI, L.; BELARDELLI, F.; GESSANI, S. Interferon γ upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.179, n.5, p.1731-1736, 1994.

DRAKE, B.L.; HEAD, J.R. Murine trophoblast can be killed by lymphokine-activated killer cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.143, n.1, p.9-14, 1989.

DROUET, C.; SHAKHOV, A.N.; JONGENEEL, C.V. Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor- α promoter in primary macrophages. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.117, p.1694-1700, 1991.

DUMOUTIER, L.; RENAULD, J.C. Viral and cellular interleukin-10 (IL-10)-related cytokines: from structures to functions. **European Cytokine Network**, Montrouge, v.13, n.1, p.5-15, 2002.

DUMOUTIER, L.; VAN ROOST, E.; COLAU, D.; RENAULD, J.C. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, p.10144-10149, 2000.

ECONOMOU, J.S.; RHOADES, K.; ESSNER, R.; McBRIDE, W.H.; GASSON, J.C.; MORTON, D.L. Genetic analysis of the human tumor necrosis factor α /cachectin promoter region in a macrophage cell line. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.170, n.1, p.321-326, 1989.

EDMONDS, D.K.; LINDSAY, K.S.; MILLER, J.F.; WILLIAMSON, E.; WOOD, P.J. Early embryonic mortality in women. **Fertility and Sterility**, New York, v.38, n.4, p.447-453, 1982.

EDWARDS-SMITH, C.J.; JONSSON, J.R.; PURDIE, D.M.; BANSAL, A.; SHORTHOUSE, C.; POWELL, E.E. Interleukin-10 Promoter Polymorphism Predict Initial Response of Chronic Hepatitis C to Interferon Alfa. **Hepatology**, Philadelphia, v.30, n.2, 1999.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunology Today**, Limerick, Copenhagen, v.18, p.487-492, 1997.

ENK, A .H.; KATZ, S.I. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.149, n.1, p.92-95, 1992.

ESKDALE, J.; GALLAGHER, G.; VERWEIJ, C.L.; KEIJSERS, V.; WESTENDORP, R.G.J.; HUIZINGA, T.W.J. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proceedings of The Natural Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, n.16, p.9465-9470, 1998.

ESKDALE, J.; KUBE, D.; TESCH, H.; GALLAGHER, G. Mapping of the human IL-10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. **Immunogenetics**, Heidelberg, v.46(2), p.120-128, 1997a.

ESKDALE, J.; WORDSWORTH, P.; BOWMAN, S.; FIELD, M.; GALLAGHER, G. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.49, n.6, p.635-639, 1997b.

FALKENSAMMER, C.; JOHRER, K.; GANDER, H.; RAMONER, R.; PUTZ, T.; RAHM, A.; GREIL, R.; BARTSCH, G.; THURNHER, M. IL-4 inhibits the TNF-alpha induced proliferation of renal cell carcinoma (RCC) and cooperates with TNF-alpha to induce apoptotic and cytokine responses by RCC: implications for antitumor immune responses. **Cancer Immunology, Immunotherapy**. Berlin, 2006, Jan 28; p.1-10 [Epub ahead of print].

FANG, I.M.; LIN, C.P.; YANG, C.H.; CHIANG, B.L.; YANG, C.M.; CHAU, L.V.; CHEN, M.S. Inhibition of experimental autoimmune anterior uveitis by adenovirus-mediated transfer of the interleukin-10 gene. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**. New York, v.21, n.6, p.420-428, 2005.

FARRAH, T.; SMITH, C.A. Emerging cytokine family. **Nature**, London, v.358, n.381, 1992.

FERNANDEZ-BOTRAN, R.; SANDERS, V.M.; MOSMANN, T.R.; VITETTA, E.S. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T Helper 1 and T Helper 2 cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.168, p.543-558, 1988.

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSSMANN, T.R. Two types of mouse helper T cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.170, p.2081-2095, 1989.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; MOORE, K.W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.146, n.10, p.3444-3451, 1991b.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.147, n.11, p.3815-3822, 1991a.

FLEMING, S.B.; McCAUGHAN, C.A.; ANDREWS, A .E.; NASH, A .D.; MERCER, A. A. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus of virus. **Journal of Virology**, Washington, v.71, p.4857-4861, 1997.

FORBES, L. S. The evolutionary biology of spontaneous abortion in humans. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v.12, p.446-450, 1997.

FRASER, E.J.; GRIMES, D.A.; SCHULZ, K.F. Immunization as therapy for recurrent spontaneous abortion: a review and meta-analysis. **Obstetrics & Gynecology**, New York, v.82, n.5, p.854-859, 1993.

FRIED, M.; MUGA, R.O.; MISORE, A.O.; DUFFY, P.E. Malaria Elicits Type 1 Cytokines in the Human Placenta: IFN- γ and TNF- α Associated with Pregnancy Outcomes. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.160, p.2523-2530, 1998.

FULTZ, M.J.; BARBER, S.A.; DIEFFENBACH, C.W.; VOGEL, S.N. Induction of IFN- γ in macrophages by lipopolysaccharide. **International Immunology**, Oxford, v.5, n.11, p.1383-1392, 1993.

GAJEWSKI, T.F.; FITCH, F.W. Anti-proliferative effect of IFN- γ in immune regulation, I. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.140, n.12, p.4245-4252, 1988a.

GAJEWSKI, T.F.; FITCH, F.W. The proliferative effect of IFN- γ in immune regulation. I. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.140, p.4245-4252, 1988b.

GARCIA-LLORET, M. I.; MORRISH, D. W.; WEGMANN, T. G.; HONORE, L.; TURNER, A. R.; GUILBERT, L. J. Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. **Experimental Cell Research**, Orlando, v.214, p.46-54, 1994.

GASPERINI, S.; MARCHI, M.; CALZETTI, F.; LAUDANNA, C.; VICENTINI, L.; OLSEN, H.; MURPHY, M.; LIAO, F.; FARBER, J.; CASSATELLA, M.A. Gene expression and production of the monokine induced by IFN- γ (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-tAC), and IFN- γ -inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.162, p.4928-4937, 1999.

GENDRON, R.L., BAINES, M.G. Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. **Cellular Immunology**, Orlando, v.113, n.2, p.261-267, 1988.

GERMANN, T.; PARTENHEIMER, A. ; RUDE, E. Requirements for the growth of TH1 lymphocyte clones. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.20, n.9, p.2035-2040, 1990.

GILL, T.J.III. Immunogenetics of spontaneous abortions in humans. **Transplantation**, Baltimore, v.35, p.1-6, 1983.

GOODWIN, V.J.; SATO, T.A.; MITCHELL, MD.; KEELAN, J A. Anti-inflammatory effects of interleukin-4, interleukin-10, and transforming growth factor-beta on human placental cells in vitro. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v.40, p.319-325, 1998.

GRAY, P.W.; GOEDEL, D.V. Structure of the human immune interferon gene. **Nature**, London, v.298, n.5877, p.859-863, 1982

GREEN, D.R.; WEGMANN, T.G. In: **Progress in Immunology VI**, Cinader, B ; Miller R.G. eds. New York, Academic Press, p.1100-1112, 1986.

GRELL, M.; DOUNI, E.; WAJANT, H.; LOHDEN, M.; CLAUSS, M.; MAXEINER, B.; GEORGOPOULOS, S.; LESSLAUER, W.; KOLLIAS, G.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell**, Cambridge, v.83, p.793-802, 1995.

GRUBER, M.F.; WILLIAMS, C.C.; GERRARD, T.L. Macrophage-colony-stimulating factor expression by anti-CD45 stimulated human monocytes is transcriptionally up-regulated by IL-1 beta and inhibited by IL-4 and IL-10. **Journal of Immunology** , Bethesda, v.152, n.3, p.1354-1361, 1994.

GUIMOND, M.J.; LUROSS, J.A.; WANG, B.; TERHORST, C.; DANIAL, S.; CROY, B.A. Absence of Natural Killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. **Biology of Reproduction**, Madison, v.56, n.1, p.169-175, 1997.

GUIMOND, M.J.; WANG, B.; CROY, B.A. Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficiency (SCID) mice reverses the reproductive deficit in Natural Killer cells deficient TgE26 mice. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.187, p.217-223, 1998.

HAIMOVICI, F.; ANDERSON, D.J. Cytokines and growth factors in implantation. **Microscopy Research and Technique**, New York, v.25, n.3, p.201-207, 1993.

HAIMOVICI, F.; HILL, J.A.; ANDERSON, D.J. The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events in vitro. **Biology of Reproduction**, Madison, v.44, n.1, p.69-75, 1991.

HARA, M.; KINGSLEY, C.I.; NIIMI, M.; READ, S.; TURVEY, S.E.; BUSHELL, A .R.; MORRIS, P.J.; POWRIE, F.; WOOD, K.J. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. **Journal of Immunology** , Bethesda, v.166, n.6, p.3789-3796, 2001.

HARDY, K.J.; SAWADA, T. Human γ interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.170, n.3, p.1021-1026, 1989.

HARLAP, S.; SHIONO, P.H. Alcohol, smoking, and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. **Lancet**, Boston, v.2, n.8187, p.173-176, 1980.

HASSIAKOS, D.J.; ZOURLAS, P.A. Transcervical division of uterine septa. **Obstetrical & Gynecological Survey**, Baltimore, v.45, n.3, p.165-173, 1990.

HAUSER, S.L. Tumor necrosis factor: immunogenetics and disease. **Annals of Neurology**, Boston, v.38, p.702-704, 1995.

HEINONEN, P.K.; PYSTYNEN, P.P. Primary infertility and uterine anomalies. **Fertility and Sterility**, New York, v.40, n.3, p.311-316, 1983.

HEMMI, S.; BOHNI, R.; STARK, G.; DI MARCO, F.; AGUET, M. A novel member of the interferon receptor family complements functionality of the murine interferon γ receptor in human cells. **Cell**, Cambridge, v.76, n.5, p.803-810, 1994.

HENSLEIGH, P.A.; FAINSTAT, T. Corpus luteum dysfunction: serum progesterone levels in diagnosis and assessment of therapy for recurrent and threatened abortion. **Fertility and Sterility**, New York, v.32, n.4, p.396-400, 1979.

HILL, J. A.; POLGAR, K.; ANDERSON, D.J. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.273, n.24, p.1933-1936, 1995.

HILL, J.A .Implications of cytokines in male and female sterility. In: **Cellular and Molecular Biology of the Maternal-Fetal Relationship**, Paris, INSERM/John Libbey Eurotext, p.269-275, 1991. (CHAOUAT, G. and MOWBRAY. J.F., eds.), pp.269-275, 1991. INSERM/John Libbey Eurotext, 1991, pp.269-275.

HILL, J.A.; CHOI, B.C. Maternal immunological aspects of pregnancy success and failure. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, v.55, p.91-107, 2000.

HO, A.S.; LIU, Y.; KHAN, T.A.; HSU, D.H.; BAZAN, J.F.; MOORE, K.W. A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.90, p.11267-11271, 1993.

HOFFMANN, S.C.; STANLEY, E.M.; COX, E.D.; Di MERCURIO, B.S.; KOZIOL, D.E.; HARLAN, D.M.; KIRK, A .D.; BLAIR, P.J. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphisms distribution. **American Journal of Trasplantation**, Copenhagen, v.2, n.6, p.560-567, 2002.

HOLLENBAUGH, D.; GROSMARE, L.S.; KULLAS, C.D.; CHALUPNY, N.J.; BRAESCH-ANDERSEN, S.; NOELLE, R.J.; STAMENKOVIC, I.; LEDBETTER, J.A.; ARUFFO, A. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.11, n.12, p.4313-4321, 1992.

HUNT, J. and ORR, H.T. HLA and maternal fetal recognition. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.6, p.2344-2348, 1992.

HURME, M.; LAHDENPOHJA, N.; SANTTILA, S. Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases. **Annals of Medicine**, London, v.30, p.469-473, 1998.

INFANTE-RIVARD, C.; DAVID, M.; GAUTHIER, R.; RIVARD, G.E. Lupus anticoagulants, anticardiolipin antibodies, and fetal loss. A case-control study. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.325, n.15, p.1063-1066, 1991.

INOKO, H.; TROWSDALE, J. Linkage of TNF genes to the HLA-B locus. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.15, p.8957-8962, 1987.

ITO, S.; ANSARI, P.; SAKATSUME, M.; DICKENSHEETS, H.; VAZQUEZ, N.; DONNELLY, R.P.; LARNER, A.C.; FINBLOOM, D.S. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. **Blood**, New York, v.93, p.1456-1463, 1999.

IWASAKI, A.; KELSALL, B.L. Freshly isolated Peyer's patch, but not splen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.190, p.229-239, 1999.

JENKINS, C.; ROBERTS, J.; WILSON, R.; MACLEAN, M.A.A.; SHILITO, J.; WALKER, J.J. Evidence of a Th1 type response associated with recurrent miscarriage. **Fertility and Sterility**, New York, v.73, n.6, p.1206-1208, 2000.

JIANG, H.; LIN, J.J.; SU, Z.Z.; GOLDSTEIN, N.I.; FISHER, P.B. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. **Oncogene**, Basingstone, v.21, p.2477-2486, 1995.

JIANG, H.; SU, Z-Z.; LIN, J.J.; GOLDSTEIN, N.I.; YOUNG, C.S.H.; FISHER, P.B. The melanoma differentiation associated gene mda-7 supresses cancer cell growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.93, p.9160-9165, 1996.

JOHNSON, D.R.; POBER, J.S. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.87, n.13, p.5183-5187, 1990a.

JOHNSON, D.R.; POBER, J.S. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. **Immunology**, Oxford, v.87, p.5183-5187, 1990b.

JOHNSON, P.M.; BARNES, R.M.R.; RISK, J.M.; MOLLOY, C.M.; WOODROW, J.C. Immunogenetic studies of recurrent spontaneous abortions in humans. **Experimental and Clininical Immunogenetics**, New York, v.2, p.77-83, 1985.

JONES, B.C.; LOGSDON, N.J.; JOSEPHSON, K.; COOK, J.; BARRY, P.A.; WALTER, M.R. Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.99, n.14, p.9404-9409, 2002.

JONES, E.Y.; STUART, D.I.; WALKER, N.P. Structure of tumor necrosis factor. **Nature**, London, v.338, p.225-228, 1989.

JURADO, A.; CARBALLIDO, J.; GRIFFEL, H.; HOCHKEPPEL, H.K.; WETZEL, G.D. The immunomodulatory effects of interferon-gamma on mature B-lymphocyte responses. **Experientia**, Basel, v.45, n.6, p.521-526, 1989.

KAJII, T.; FERRIER, A.; NIIKAWA, N.; TAKAHARA, H.; OHAMA, K.; AVIRACHAN, S. Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. **Human Genetics**, Berlin, v.55, n.1, p.87-98, 1980.

KAMALI-SARVESTANI, E.; ZOLGHADRI, J.; GHARESI-FARD, B.; SARVARI, J. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdan, v.65, n.2, p.171-178, 2005.

KARHUKORPI, J.; LAITINEN, T.; KARTTUNEN, R.; TIILIKAINEN, A .S. The functionally important IL-10 promoter polymorphism (-1082G-->A) is not a major genetic regulator in recurrent spontaneous abortions. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.7, n.2, p.201-203, 2001.

KASAHARA, K.; DJEU, J.Y.; DOUGHERTY, S.F.; OPPENHEIM, J.J. Capacity of human large granular lymphocytes (LGL) to produce multiple lymphokynes: interleukin 2, interferon, and colony stimulating factor. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.131, n.5, p.2379-2385, 1983b.

KASAHARA, T.; HOOKS, J.J.; DOUGHERTY, S.F.; OPPENHEIM, J.J. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells ad T cells subsets. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.130, n.4, p.1784-1789, 1983a.

KATSURA, Y. Cell-mediated and humoral immune responses in mice.III. Dynamic balance between delayed-type hipersensitivity and antibody response. **Immunology**, Oxford, v.32, p.227-235, 1977.

KENDALL, L.V.; RILEY, L.K.; HOOK, R.R.JR; BESCH-WILLIFORD, C.L.; FRANKLIN, C.L. Differential interleukin-10 and gamma interferon mRNA expression in lungs of cilium-associated respiratory bacillus-infected mice. **Infection and Immunity**, Washington, v.69, n.6, p.3697-3702, 2001.

KHANI-HANJANIA, A.; HOARD, D.; HORSMANB, D.; KEOWN, P. Identification of four novel dinucleotide repeat polymorphisms in the TNF- α and TNF- β genes. **Human Immunology**, New York, v.61, p.511-512, 2000.

KHANNA, A.; MORELLI, A .E.; ZHONG, C.; TAKAYAMA, T.; LU, L.; THOMSON, A .W. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.164, p.1346-1354, 2000.

KIM, J.M.; BRANNAN, C.I.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; KHAN, T.A.; MOORE, K.W. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. **Journal of Immunology** , Bethesda, v.148, n.11, p.3618-3623, 1992.

KINSKY, R.; DELAGE, G.; ROSIN, N.; THANG, M.N.; HOFFMANN, M., CHAOUAT, G. A murine model of NK cell mediated resorption. . **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhegen, v.23, n.3, p.73-77, 1990.

KNAPPE, A.; HOR, S.; WITTMANN, S.; FICKENSCHER, H. Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri. **Journal of Virology**, Washington, v.74, p.3881-3887, 2000.

KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R.M.; CLARK, S.C.; CHAN, S.; LOUDON, R.; SHERMAN, F.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.170, n.3, p.827-845, 1989.

KOBAYASHI, Y.; ASADA, M.; OSAWA, T. Production of lymphotoxin and tumour necrosis factor by a T-cell hybridoma. **Immunology**, Oxford, v.60, n.2, p.213-217, 1997.

KOPYDLOWSKI, K.M.; SALKOWSKI, C.A.; CODY, M.J.; VAN ROOIJEN, N.; MAJOR, J.; HAMILTON, T.A.; VOGEL, S.N. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.163, n.3, p.1537-1544, 1999.

KORNER, H.; COOK, M.; RIMINTON D.S.; LEMCKERT, F.A.; HOCK, R.M.; LEDERMANN, B.; KONTGEN, F.; SAINT GROTH, B.F.; SEDGWICK, J.D. Distinct roles for lymphotoxin- α and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.27, p.2600-2609, 1997.

KOTENKO, S.V.; SACCANI, S.; IZOTOVA, L.S.; MIROCHNITCHENKO, O.V.; PESTKA, S. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, p.1695-1700, 2000.

KRISHNAN L.; GUILBERT, L.J.; RUSSEL, A.S.; WEGMANN, T.G.; MOSMANN, T.R.; BELOSEVIC, M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen specific IFN- γ responses and increased production of T helper 2 cytokines. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.156, p.644-652, 1996a.

KRISHNAN L.; GUILBERT, L.J.; WEGMANN, T.G.; BELOSEVIC, M.; MOSMANN, T.R. T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN- γ and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.156, p.653-662, 1996b.

KRUSE, C.; STEFFENSEN, R.; VARMING, K.; CHRISTIANSEN OB. A study of HLA-DR and -DQ alleles in 588 patients and 562 controls confirms that HLA-DRB1*03 is associated with recurrent miscarriage. **Human Reproduction**, Oxford, v.19, n.5, p.1215-1221, 2004.

KRUSE, N.; GREIF, M.; MORIABADI, N.F.; MARX, L.; TOYKA, K.V.; RIECKMANN, P. Variations in cytokine mRNA expression during normal human pregnancy. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.119, p.317-322, 2000.

KUBE, D.; PLATZER, C.; VON KNETHEN, A.; STRAUB, H.; BOHLEN, H.; HAFNER, M.; TESCH, H. Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. **Cytokine**, London, v.7, n.1, p.1-7, 1995.

KWAK, J.Y.; BEAMAN, K.D.; GILMAN-SACHS, A ., RUIZ, J.E., SCHEWITZ, D., BEER, A .E. Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+, and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v.34, n.2, p.93-99, 1995.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.R. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HWM DNA from blood for RFPL studies. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, p.5444, 1991.

LAMM, L.U.; FRIEDRICH, U.; PETERSON, G.B.; JORGENSON, J.; NIELSEN, J.; THERKELSEN, A.J.; KISSMEYER-NIELSEN, F. Assignment of the major histocompatibility complex to chromosome n° 6 in a family with a pericentric inversion. **Human Heredity**, Basel, v.24, p.273-284, 1974.

LAMM, L.U.; OLAISEN, B. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 5 and 6. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.40, p.128,1985.

LE GROS, S.; BEN-SASSON, S.Z.; SEDER, R.; FINKELMAN, F.D.; PAUL, W.E. Generation of interleukin-4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro-IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.172, p.921-929, 1990.

LEA, R.G.; CLARK D.A. Effects of decidual cell supernatants and lymphokines on murine trophoblast growth in vitro. **Biology of Reproduction**, Madison, v.48, n.4, p.930-935, 1993.

LEA, R.G.; UNDERWOOD, J.; FLANDERS, K.C.; HIRTE, H.; BANWATT, D.; FINOTTO, S.; OHNO, I.; DAYA, S.; HARLEY, C.; MICHEL, M. A subset of patients with recurrent spontaneous abortion is deficient in transforming growth factor beta-2-producing "supressor cells" in uterine tissue near the placental attachment site. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v.34, n.1, p.52-64, 1995.

LEES, D.H.; SUTHERST, J.R. The sequelae of cervical trauma. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St Louis, v.120, n.8, p.1050-1054, 1974.

LIN, H.; MOSMANN, T.R.; TUNTIPOPITAT, S.; WEGMANN, T.G. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.151, p.4562-4573, 1993.

LIU, Y.W.; CHEN, C.C.; TSENG, H.P.; CHANG, W.C. Lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of interleukin-10 is mediated by MAPK- and NF-kappaB-induced CCAAT/enhancer-binding protein delta in mouse macrophages. **Cellular Signaling**, New York (Epub ahead of print), 2006.

LOKE, Y.W.; KING, A.; Human Implantation; Cell Biology and Immunology; Cambridge University Press; Cambridge; 1995.

MACMASTER, M.T.; NEWTON, R.C.; SUDHANSKI, K.D.E.Y.; ANDREWS, G.K. Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.148, p.1699-1705, 1992.

MAKHATADZCA, N.J. Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. **Human Immunology**, New York, v.59, p.571-579, 1998.

MANTOVANI, A.; BUSSOLINO, F.; INTRONA, M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. **Immunology Today**, Cambridge, v.18, p.231-240, 1997.

McDONALD, A.D.; ARMSTRONG, B.G.; SLOAN, M. Cigarette, alcohol, and coffee consumption and congenital defects. **Amerian Journal of Public Health**, Washington, v.82, n.1, p.91-93, 1992.

McGUIRK., P.; CANN, C.; MILK, K.H. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.195, n.2, p.221-231, 2002.

McINTYRE, J.A.; FAULK, W.P.; NICHOLS-JOHNSON, V.R.; TAYLOR, C.G. Immunologic testing and immunotherapy in recurrent spontaneous abortions. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v.67, p.169-175, 1986.

MEANS, R.T., Jr.; KRANTZ, S.B.; LUNA, J.; MARSTERS, S.A.; ASHKENAZI, A. Inhibition of murine erythroid colony formation in vitro by interferon- γ and correction by interferon receptor immunoadhesin. **Blood**, New York, v.83, n.4, p.911-915, 1994.

MEENAGH, A.; WILLIAMS, F.; ROSS, O.A.; PATTERSON, C.; GORODEZKY, C.; HAMMOND, M.; LEHENY, W.A.; MIDDLETON, D. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. **Human Immunology**, Limerick, v.63, p.1055-1061, 2002.

MELVIN, A.J.; MCGURN, M.E.; BORT, S.J.; GIBSON, C.; LEWIS, D.B. Hypomethylation of the interferon- γ gene correlates with its expression by primary T-lineage cells. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.25, n.2, p.426-430, 1995.

MESSER, G.; SPENGLER, U.; JUNG, M.C.; HONOLD, G.; BLOMER, K.; PAPE, G.R.; RIETHMULLER, G.; WEISS, E.H. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF- β gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF- β production. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.173, p.209-219, 1991.

METCALF, D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. **Nature**, London, v.339, n.6219, p.27-30, 1989.

MEYAARD, L.; HOVENKAMP, E.; OTTO, S.A.; MIEDEMA, F. IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.156, n.8, p.2776-2782, 1996.

MILLER, M.P.; RXC: A program for the analysis of the contingency. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, **Northern Arizona**, 1997.

MOHAPELOA, H.; CHRISTIANSEN, OB.; GRUNNET, N. HLA-DR typing of women with recurrent late spontaneous abortion and unsuccessful cervical cerclage. **Human Reproduction**, Oxford, v.13, n.4, p.1079-1082, 1998.

MOMOSE, T.; OKUBO, Y.; HORIE, S.; TAKASHI, S.; TSUKADAIRA, A.; SUZUKI, J. ISOBÉ, M.; SEKIGUCHI, M. Interferon-gamma increases CD62L expression on human eosinophils. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.120, Suppl.1, p.30-33, 1999.

MOND, J.J.; CARMAN, J.; SARMA, C.; O'HARA, J.; FINKELMAN, F.D. Interferon-gamma suppresses B cell stimulation factor (BSF-1) induction of class II MHC determinants on B cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.137, n.11, p.3534-3537, 1986.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and interleukin 10 receptor. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.19, p.683-765, 2001.

MOORE, K.W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D.F.; TROUNSTINE, M.L.; KHAN, T.A.; MOSMANN, T.R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science**, Washington, v.248, p.1230-1234, 1990.

MOREAU, P.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; GUIARD, V.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. **International Immunology**, Oxford, v.11, n.5, p.803-811, 1999.

MORSE, H.R.; OLOMOLAIYE, O.O.; WOOD, N.A.P.; KEEN, L.J.; BIDWELL, J.L. Induced heteroduplex genotyping of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 polymorphisms associated with transcriptional regulation. **Cytokine**, London, v.11, n.10, p.789-795, 1999.

MOSMANN, T.R. Properties and functions of interleukin-10. **Advances in Immunology**, New York, v.56, p.1-26, 1994.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, Limerick, v.136, p.2348-2357, 1986.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Advances in Immunology**, New York, v.46, p.111-147, 1989b.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.7, p.145-173, 1989a.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, Cambridge, v.17, n.3, p.138-146, 1996.

MULLER, M.; BRISCOE, J.; LAXTON, C.; GUSCHIN, D.; ZIEMIECKI, A.; SILVENNOINEN, O.; HARPUR, A.G.; BARBIERI, G.; WITTHUHN, B. A.; SCHINDLER, C. The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and γ -signal transduction. **Nature**, London, v.366, n.6451, p.129-135, 1993.

MUROHASHI, I.; HOANG, T. Interferon- γ enhances growth factor-dependent proliferation of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. **Blood**, New York, v.78, n.4, p.1085-1095, 1991.

NATHAN, C.F.; MURRAY, H.W.; WIEBE, M.E.; RUBIN, B.Y. Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and anti-microbial activity. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.158, n.3, p.670-689, 1983.

NEDWIN, G.E.; NAYLOR, S. L.; SAKAGUCH, A.Y.; SMITH, D.; JARRETT-NEDWIN, J.; PENNICA, D.; GOEDDEL, D.V. and GRAY, P.W. Human lymphotoxin and tumor necrosis genes: structure, homology and chromosomal localization. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.13, p.6361-6372, 1985.

NIIRO, H.; OTSUKA, T.; KUGA, S.; NEMOTO, Y.; ABE, M.; HARA, N.; NAKANO, T.; OGO, T.; NIHO, Y. IL-10 inhibits prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-stimulated monocytes. **International Immunology**, Oxford, v.6, n.4, p.661-664, 1994.

NIIRO, H.; OTSUKA, T.; TANABE, T.; HARA, S.; KUGA, S.; NEMOTO, Y.; TANAKA, Y.; NAKASHIMA, H.; KITAJIMA, S.; ABE, M. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. **Blood**, New York, v.85, n.12, p.3736-3745, 1995.

NITTA, T.; EBATO, M.; SATO, K.; OKUMURA, K. Expression of tumour necrosis factor- α , β and interferon- γ genes within human neuroglial tumor cells and brain specimens. **Cytokine**, London, v.6, n.2, p.171-180, 1994.

OETTINGER, M.A.; SCHATZ, D.G.; GORKA, C.; BALTIMORE, D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. **Science**, Washington, v.248, n.4962, p.1517-23, 1990.

OKSENBERG, J.K.; PERSITZ, E.; AMAR, A.; BRAUBAR, C. Maternal-paternal histocompatibility: lack of association with habitual abortions. **Fertility and Sterility**, New York, v.42, p.389-395, 1984.

OLD, L.J. Another chapter in the long history of endotoxin. **Nature**, London, v.330, p.602-603, 1987.

OLIFF, A. The role of tumor necrosis factor (cachectin) in cachexia. **Cell**, Cambridge, v.54, p.141-142, 1988.

PACE, J.L.; RUSSELL, S.W.; TORRES, B.A.; JOHNSON, H.M.; GRAY, P.W. Recombinant mouse γ -interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. **Journal of immunology**, Bethesda, v.130, n.5, p.2011-2013, 1983.

PANG, Y.; NORIHISA, Y.; BENJAMIN, D.; KANTOR, R.S.; YOUNG, H.A. Interferon- γ gene expression in human B-cells lines: induction by interleukin-2, protein kinase C activators, and possible effect of hypomethylation on gene regulation. **Blood**, New York, v.80, n.3, p.724-732, 1992.

PARISH, C.R. The relationship between humoral and cell-mediated immunity. **Transplantation Reviews**, Copenhagen, v.13, p.35-65, 1972.

PAUL, W.E.; SEDER, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell**, Cambridge, v.76, n.2, p.241-251, 1994.

PENIX, L.; WEAVER, W.M.; PANG, Y.; YOUNG, H.A.; WILSON, C.B. Two essential regulatory elements in the human IFN- γ promoter confer activation specific expression in T cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.178, n.5, p.1483-1496, 1993.

PENNICA, D.; NEDWIN, G.E.; HAYFLIK, J.S.; SEEBURG, P.H.; DERYNCK, R.; PALLADINO, M.A.; KOHR, W.J.; AGGARWAL, B.B.; GOEDDEL, D.V. Human tumor necrosis factor: precursor, structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**, London, v.312, p.724-728, 1984.

PERREY, C.; PRAVICA, V.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. Genotyping for polymorphisms in Interferon- γ , Interleukin-10, Transforming Growth Factor- β 1 and Tumor Necrosis Factor- α gene: a technical report. **Transplant Immunology**, Oxford, v.6, n.3, p.193-197, 1998.

PERREY, C.; TURNER, S.J.; PRAVICA, V.; HOWELL, W.M.; HUTCHINSON, I.V. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF- α , TNF- β and TGF- β 1 gene polymorphisms. **Transplant Immunology**, Oxford, v.7, p.127-128, 1999.

PERUSSIA, B.; DAYTON, E.T.; FANNING, V.; THIAGARAJAN, P.; HOXIE, J.; TRINCHIERI, G. Immune interferon and leukocyte conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.158, n. 6, p.2058-2080, 1983b.

PERUSSIA, B.; DAYTON, E.T.; LAZARUS, R.; FANNING, V.; TRINCHIERI, G. Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.158, n.4, p.1092-1113, 1983a.

PERUSSIA, B.; KOBAYASHI, M.; ROSSI, M.E.; ANEGON, I.; TRINCHIERI, G. Immune interferon enhances functional properties of human granulocytes: role of Fc receptors and effect of lymphotoxin, tumor necrosis factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.138, n.3, p.765-774, 1987.

PETERS, P.M.; ORTALDO, J.R.; SHALABY, M.R.; SVEDERSKY, L.P.; NEDWIN, G.E.; BRINGMAN, T.S.; HASS, P.E.; AGGARWAL, B.B.; HERBERMAN, R.B.; GOEDDEL, D.V. Natural killer-sensitive targets stimulate production of TNF-alpha but not TNF-beta (lymphotoxin) by highly purified human peripheral blood large granular lymphocytes. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.137, n.8, p.2592-2598, 1986.

PETRONI, K.C.; SHEN, L.; GUYRE, P.M. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN-gamma and glucocorticoids. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.140, n.3, p.3467-3472, 1988.

PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P.; SCHLUTER, C.; KRONKE, M. Tumor necrosis factor enhances HLA-A, B, C and HLA-DR gene expression in human tumor cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.138, p.975-980, 1987.

PICCINNI, M.P.; GIUDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R.; BELONI, L.; GIANNARINI, L.; SAMPOGNARO, S.; PARRONCHI, P.; MANETTI, R.; ANNUNCIATO, F.; LIVI, C.; ROMAGNINI, S.; MAGGI, E. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.155, n.1, p.128-133, 1995.

PICCINNI, M.P.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S. Role of hormone-controlled T-cell cytokines in maintenance of pregnancy. **Biochemical Society Transactions**, London, v.28, n.2, p.212-215, 2000.

PICCOTTI, J.R.; CHAN, S.Y.; VANBUSKIRK, A.M.; EICHWALD, E.J.; BISHOP, D.K. Are Th2 helper T lymphocytes beneficial, deleterious, or irrelevant in promoting allograft survival? **Transplantation**, Baltimore, v.63, p.619-624, 1997.

PIETROWSKI, D.; BETTENDORF, H.; KECK, C.; BURKLE, B.; UNFRIED, G.; RIENER, E.K.; HEFLER, L.A.; TEMPFER, C. Lack of association of TNFalpha gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in Caucasian women. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v.61, n.1, p.51-58, 2004.

POCIOT, F.; BRIANT, L.; JONGENEEL, C.V.; MOLVIG, J.; WORSAAE, H.; ABBAL, M.; THOMSEN, M.; NERUP, J.; CAMBON-THOMSEN, A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- α and TNF- β by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.23, p.224-231, 1993.

POLIFKA, J.E.; FRIEDMAN, J.M. Environmental toxins and recurrent pregnancy loss. **Infertil. Reprod. Med. Clin. North Am.**, v.2, p.195-199, 1991

PRAVICA, V.; ASDERAKIS, A.; PERREY, C.; HAJEER, A.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON I.V. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene, **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v.26, n.1, p.1-3, 1999.

PRAVICA, V.; PERREY, C.; STEVENS, A.; LEE, J.H.; HUTCHINSON I.V. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. **Human Immunology**, New York, v.61, p.863-866, 2000.

PRIGOSHIN, N.; TAMBUTTI, M.; LARRIBA, J.; GOGORZA, S.; TESTA, R. Cytokine Gene polymorphisms in Recurrent Pregnancy Loss of Unknown Cause. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v.52, p.36-41, 2004.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: succes and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v.13, p.219-227, 2001.

RAGHUPATHY, R.; TANGRI, S. Immunodystrophism, T cells, cytokines, and pregnancy failure. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copehnagen, v.35, n.4, p.291-296, 1996.

RASHIDBAIGI, A.; LANGER, J.A.; JUNG, V.; JONES, C.; MORSE, H.G.; TISCHFIELD, J.A.; TRILL, J.J.; KUNG, H.F.; PESTKA, S. The gene for the human immune interferon receptor is located on chromosome 6. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.83, n.2, p.384-388, 1986.

REID, J.G.; SIMPSON, N.A; WALKER, R.G.; ECONOMIDOU, O; SHILLITO, J.; GOOI, H.C.; DUFFY, S.R.; WALKER, J.J. The carriage of pro-inflammatory cytokine gene polymorphism in recurrent pregnancy loss. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v.45, n.1, p.35-40, 2001.

RICHARDS, A .L.; OKUNO, T.; TAKAGAKI, Y.; DJEU, J.Y. Natural cytotoxic cell-specific cytotoxic factor produced by IL-3-dependent basophilic/mast cells. Relationship to TNF. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.141, n.9, p.3061-3066, 1988.

RINDERKNECHT, E.; O'CONNOR, B.H., RODRIGUEZ, H. Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.259, n.11, p.6790-6797, 1984.

RINK, L.; KIRCHNER, H. Recent progress in the tumor necrosis factor- α field. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.111, p.199-209, 1996.

RIVERA, D.L.; OLISTER, S.M.; LIU, X.; THOMPSON, J.H.; ZHANG, X. J.; PENNLIN, K.; AZUERO, R.; CLARK, D.A.; MILLER, J.S. Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.12, p.189-197, 1998.

ROBERTS, A. K., MONZON-BORDONABA, F., VAN DEERLIN, P.G., HOLDER, J., MACONES, G. A., MORGAN, M. A. ; STRAUSS, J. F., PARRY, S. Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor α gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v.180, n.5, p.1297-1302, 1999.

ROBERTSON, S.A.; SEAMARK, R.F.; GUILBERT, L.J.; WEGMANN, T. G. The role of cytokines in gestation. **Critical Reviews in Immunology**, New York, v.14, p.239-292, 1994.

ROCK, J.A.; MURPHY, A.A. Anatomic abnormalities. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Hagerstown, v.29, n.4, p.886-911, 1986.

RODE, H.J.; JANSSEN, W.; ROSEN-WOLFF, A.; BUGERT, J.J.; THEIN, P.; BECKER, Y.; DARAI, G. The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin 10 (IL-10)-like gene. **Virus Genes**, Dordrecht, v.7, p.111-116, 1993.

ROYER, B.; VARADARADJALOU, S.; SAAS, P.; GABIOT, A. C.; KANTELIP, B.; FEGER, F.; GUILLOSON, J.J.; KANTELIP, J.P.; AROCK, M. Autocrine regulation of cord blood-derived human mast cell activation by IL-10. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v.108, n.1, p.80-86, 2001.

SAITO, S. Cytokine network at the feto-maternal interface. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v.47, p.87-103, 2000.

SAITO, S.; SAKAI, M.; SASAKI, Y.; TANEBE, K.; TSUDA, H.; MICHIMATA, T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during human pregnancy and preeclampsia. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 117, p.550-555, 1999.

SANFORD, T.R.; DE, M.; WOOD, G. Expression of colony stimulating factors and inflammatory cytokines in the uterus in CD21 mice during days 1 to days 3 of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.94, n.1, p.213-220, 1992.

SASAKI, T.; YAMADA, H.; KATO, E.H.; SUDO, S.; KISHIDA, T.; SASAKI, T.; NISHIGAKI, F.; FUJIMOTO, S. Increased frequency of HLA-DR4 allele in women with unexplained recurrent spontaneous abortions, detected by the method of PCR-SSP. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon , v.32, p.237-279, 1997.

SCHATZ, D.G.; OETTINGER, M.A.; BALTIMORE, D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. **Cell**, Cambridge, v.59, n.6, p.1035-1048, 1989.

SCHNEIDER, S.; KUEFER, J.M.; ROESLLI, D.; EXCOFIER, L. ARLEQUIN: a software for population genetics analysis, version 1.1. Genetics and Biometry laboratories, Dept. of Anthropology, University of Geneva, 2000.

SCHULTZ, R.M.; KLEINSCHMIDT, W. Functional identity between murine interferon and macrophage activating factor. **Nature**, London, v.305, n.5931, p.239-240, 1983.

SHAW, G.; KAMEN, R. A conserved AU sequence from 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. **Cell**, Cambridge, v.46, n.5, p.659-667, 1986.

SHIOHARA, M.; KOIKE, K.; NAKAHATA, T. Synergism of interferon- γ and stem cell factor on the development of murine hematopoietic progenitors in serum-free culture. **Blood**, New York, v.81, n.6, p.1435-1441, 1993.

SHIOHARA, M.; KOIKE, K.; NAKAHATA, T.; KOMIYAMA, A. Hematopoietic progenitors and synergism of interferon- γ and stem cell factor. **Leukemia & Lymphoma**, Reading, v.14, n.3-4, p.203-211, 1994.

SHIRAI, T.; YAMAGUCHI, H.; ITO, H.; TODD, C.W.; WALLACE, R.B. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumor necrosis factor. **Nature**, London, v.313, p.803-806, 1985.

SHUAI, K.; SCHINDLER, C.; PREZIOSO, V.R.; DARNELL, J.E. Jr. Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. **Science**, Washington, v.258, n.5089, p.1808-1812, 1992.

SHUAI, K.; STARK, G.R.; KERR, I.M.; DARNELL, J.E., Jr. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon- γ . **Science**, Washington, v.261, n.5129, p.1744-1746, 1993.

SIMON, C.; FRANCES, A.; PIQUETTE, G.N.; HENDRICKSON, M.; MILKI, A.; POLAN, M.L. Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation. Immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Bethesda, v.78, n.4, p.847-854, 1994.

SNAPPER, C.M.; PESCHEL, C.; PAUL, W.E. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells Stimulated with bacterial lipopolysaccharide. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.140, n.7, p.2121-2127, 1988.

SOH, J.; DONELLY, R.J.; KOTENKO, S.; MARIANO, T.M.; COOK, J.R.; WANG, N.; EMANUEL, S.; SCHWARTZ, B.; MIKI, P.; PESTKA, S. Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon γ receptor. **Cell**, Cambridge, v.76, n.5, p.793-802, 1994.

SOO, C.; SHAW, W.W.; FREYMILLER, E.; LONGAKER, M.T.; BERTOLAMI, C.N.; CHIU, R.; TIEU, A.; TING, K. Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v.74, p.1-10, 1999.

SPITTLER, A.; SCHILLER, C.; WILHEIM, M.; TEMPFER, C.; WINKLER, S.; BOLTZ-NITULESCU, G. IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. **Immunology**, Oxford, v.85, n.2, p.311-317, 1995.

SPOELSTRA, F.M.; POSTMA, D.S.; HOVENGA, H.; NOORDHOEK, J.A.; KAUFFMAN, H.F. Interferon-gamma and interleukin-4 differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human lung fibroblasts. **European Respiratory Journal**, Denmark, v. 14, n.4, p.759-766, 1999.

STECK, T.; VAN DER VEN, K.; KWAK, J.; BEER, A.; OBER C. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 haplotypes in aborted fetuses and couples with recurrent spontaneous abortion. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v.29, n.2, p.95-104, 1995.

STEFFEN, M.; ABBOUD, M.; POTTER, G.K.; YUNG, Y.P.; MOORE, M.A. Presence of tumor necrosis factor or a related factor in human basophil/mast cells. **Immunology**, Oxford, v.66, n.3, p.445-450, 1989.

STEINBRINK, K.; GRAULICH, E.; KUBSCH, S.; KNOP, J.; ENK, A.H. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. **Blood**, New York, v.99, n.7, p.2468-2476, 2002.

STEINBRINK, K.; JONULEIT, H.; MULLER, G.; SCHULER, G.; KNOP, J.; ENK, A.H. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. **Blood**, New York, v.93, p.1634-1642, 1999.

STEINBRINK, K.; WOLFL, M.; JONULEIT, H.; KNOP, J.; ENK, A.H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.159, n.10, p.4772-4780, 1997.

STIRRAT, G.M. Recurrent miscarriage. II: Clinical associations, causes, and management. **Lancet**, Boston, v.236, n.8717, p.728-733, 1990b.

STIRRAT, G.M. Recurrent miscarriage. **Lancet**, Boston, v.336, v.8716, p.673-675, 1990a.

STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLow, T.G. **Imunologia Médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 689p.

SU, Z.Z.; MADIREDDI, M.T.; LIN, J.J.; YOUNG, C.S.; KITADA, S.; REED, J.C.; GOLDSTEIN, N.I.; FISHER, P.B. The cancer growth suppressor gene mda-7 selectively induces apoptosis in human breast cancer cells and inhibits tumor growth in nude mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, p.14400-14405, 1998.

SUFFYS, P.; BEYAERT, R.; VAN ROY, F.; FIERS, W. TNF in combination with interferon-gamma is cytotoxic to normal, untransformed mouse and rat embryo fibroblast-like cells. **Anticancer Research**, Attiki, v.9, n.1, p.167-171, 1989.

SUN, A.; WANG, J.T.; CHIA, J.S.; CHIANG, C.P. Levamisole can modulate the serum tumor necrosis factor-alpha level in patients with recurrent aphthous ulcerations. **Journal of oral pathology & medicine**, Copenhagen, v.35, n.2, p.111-116, 2006.

SWAIN, S.L.; WEINBERG, A. D.; ENGLISH, M.; HUSTON, G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.145, p.3796-3806, 1990.

SZONY, B.J.; BATA-CSORGO, Z.; BARTFAI, G.; KEMENY, L.; DOBOZY, A. ; KOVACS, L. Interleukin-10 receptors are expressed by basement membrane anchored, alpha (6) integrin (+) cytotrophoblast cells in early human placenta. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.5, p.1059-1065, 1999.

TAGORE, A.; GONSALKORALE, W.M.; PRAVICA, V.; HAJEER, A.H.; McMAHON, R.; WHORWELL, P.J.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.54, p.386-390, 1999.

TAKAKUWA, K.; ADACHI, H.; HATAYA, I.; ISHII, K.; TAMURA, M.; TANAKA, K. Molecular genetic studies of HLA-DRB1 alleles in patients with unexplained recurrent abortion in Japanese population. **Human Reproduction**, Oxford, v.18, n.4, p.728-733, 2003.

TAKAMIZAWA, M.; JUJI, T.; TSUNEYOSHI, H.; NIEDA, M.; FUJII, T.; KAWANA, T.; MIZUNO, M. Recurrent spontaneous abortion and human leukocyte antigen DRw8. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v.157, p.514-515, 1987.

TAKANASHI, S.; NONAKA, R.; XING-ZHOU, O.; BYRNE, P.; DOLOVICH, J. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.180, n.2, p.711-714, 1994.

TAN, J.C.; INDELICATO, S.R.; NARULA, S.K.; ZAVODNY, P.J.; CHOU, C.C. Characterization of interleukin-10 receptors on human mouse cells. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.268, n.28, p.21053-21059, 1993.

TARTAGLIA, L.A.; GOEDEL, D.V. Two TNF receptors. **Immunology Today**, Cambridge, v.13, p.151-153, 1992.

TARTAKOVSKY, B.; BEN-YAIR, E. Cytokines modulate preimplantation development and pregnancy. **Developmental Biology**, Orlando, v.146, n.2, p.345-352, 1991.

TE VELDE, A.A.; DE WAAL MALEFYT, R.; HUIJBENS, R.J.; DE VRIES, J.E.; FIGDOR, C.G. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.149, n.12, p.4048-4052, 1992.

THOMPSON-SNIPES, L.; DHAR, V.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R.; MOORE, K.W.; RENNICK, D.M. Interleukin-10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.173, n.2, p.507-510, 1991.

TODD, J.A.; ACHA-ORBEA, H.; BELL, J.I.; CHAO, N.; FRONEK, Z.; JACOB, C.O.; MCDERMOTT, M.; SINHA, A.A.; TIMMERMAN, L.; STEINMAN, L. A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. **Science**, Washington, v.240, n.4855, p.1003-1009, 1988.

TONE, M.; POWELL, M.J.; TONE, Y.; THOMPSON, S.A.; WALDMANN, H. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.165, p.286-291, 2000.

TORRICO, F.; HEREMANS, H.; RIVERA, M.T.; VAN MARCK, E.; BILLIAU, A.; CARLIER, Y. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.146, n.10, p.3626-3632, 1991.

TRENT, J.M.; OLSON, S.; LAWN, R.M. Chromosomal localization of human leukocytes, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.79, n.24, p.7809-7813, 1982.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in generation of Th1 cells. **Immunology Today**, Limerick, v.14, p.335-338, 1993.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. **Blood**, New York, v.84, p.4008-4027, 1994.

TURNER, D.; GRANT, S.C.D.; YONAN, N.; SHELDON, S.; DYER, P.A.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. **Transplantation**, Baltimore, v.64, n.5, p.776-779, 1997b.

TURNER, D.M.; GRANT, S.C.D.; LAMB, W.R.; BRECHLEY, P.E.C.; DYER, P.A.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I.V. A genetic marker of high TNF- α production in heart transplant recipients. **Transplantation**, Baltimore, v.60, p.1113-1117, 1995.

TURNER, D.M.; WILLIAMS, D.M.; SANKARAN, D.; LAZARUS, M.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v.24, p.1-8, 1997a.

UCLA, C.; ROUX-LOMBARD, P.; FEY, S.; DAYER, J.M.; MACH, B. Interferon gamma drastically modifies the regulation of interleukin 1 genes by endotoxin in U937 cells. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.85, n.1, p.185-191, 1990.

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.10, p.411-452, 1992.

VELTROP, M.H.; LANGERMANS, J.A.; THOMPSON, J.; BANCSI, M.J. Interleukin-10 regulates the tissue factor activity of monocytes in an in vitro model of bacterial endocarditis. **Infection and Immunity**, Washington, v.69, n.5, p.3197-31202, 2001.

VIEIRA, P.; de WAAL-MALEFYT, R.; DANG, M.N.; FIORENTINO, D.F.; de VRIES, J.E.; RONCAROLO, M.G.; MOSMANN, T.R.; MOORE, K.W. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF/IL-10) cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, p.1172-1176, 1991.

WAGENKNECHT, D.R.; GREEN, K.M.; MCINTYRE, J.A. Analyses of HLA-DQ alleles in recurrent spontaneous abortion (RSA) couples. **American Journal of Reproductive Immunology**, Copenhagen, v.37, n.1, p.1-6, 1997.

WALTER, M.R.; WINDSOR, W.T.; NAGABHUSHAN, T.L.; LUNDELL, D.J.; LUNN, C. A.; ZAUODNY, P.J.; NARULA, S.K. Crystal structure of a complex between interferon- γ and its soluble high affinity receptor. **Nature**, London, v.367, p.230-235, 1995.

WANG, X.P.; LIN, Q.D.; LU, P.H.; MA, Z.W.; ZHAO, A.M. Association of HLA-DQB1 coding region with unexplained recurrent spontaneous abortion. **Chinese Medical Journal**, Peking, v.117, n.4, p.492-497, 2004.

WARBURTON, D.; FRASER, F.C. Spontaneous abortion risks in man: data from reproductive histories collected in a medical genetic unit. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.16, p.1-17, 1964.

WATLING, D.; GUSCHIN, D.; MULLER, M.; SILVENNOINEN, O.; WTTUHN, B.A.; QUELLE, F.W.; ROGERS, N.C.; SCHINDLER, C.; STARK, G.R.; IHLE, J.N.; KERR, I.M. Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon- γ signal transduction pathway. **Nature**, London, v.366, n.6451, p.166-170, 1993.

WEBB, G.C.; CHAPLIN, D.D. Genetic variability at the human Tumor Necrosis Factor loci. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.145, n.1, p.1278-1285, 1990.

WEGMANN, T.G. Foetal protection against abortion: is it immunosuppression or immunostimulation? **Annals of Immunology**, Paris, v.135, p.309-312, 1984.

WEGMANN, T.G. Maternal T cells promote placental growth and prevent spontaneous abortion. **Annals of Immunology**, Paris, v.17, n.4, p.297-302, 1988.

WEGMANN, T.G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T.R. Bidirectional cytokine interactions in maternal-fetal relationship: is succesful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunology Today**, Cambridge, v.14, n.7, p.353-356, 1993.

WESTENDORP, R.G.; LANGERMANS, J.A .; HUIZINGA, T.W.; ELOUALI, A .H.; VERWEIJ, C.L.; BOOMSMA, D.I.; VANDENBROUCKE, J.P. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. **Lancet**, Boston, v.349, n.9046, p.170-173, 1997.

WHEELLOCK, F.F. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. **Science**, Washington, v.149, p.310-311, 1965.

WILCOX, A.J.; WEINBERG, C.R.; O'CONNOR, J.F.; BAIRD, D.D.; SCHLATTERER, J.P.; CANFIELD, R.E.; ARMSTRONG, E.G.; NISULA, B.C. Incidence of early loss of pregnancy. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.319, n.4, p.189-194, 1988.

WILLIAMS, J.G.; JURKOVICH, G.J.; MAIER, R.V. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v.54, n.1, p.79-93, 1993.

WILSON, A .G.; DiGIOVINI, F.S.; BLAKEMORE, A .I.; DUFF, G.W. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.1, n.5, p.353, 1992.

WILSON, A.G.; de VRIES, N.; POCIOT, F.; DI GIOVINE, F.S.; van der PUTTE, L.B. A. e DUFF, G.W. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor α promoter region is strongly associated with HLA -A1, -B8 and -DR3 alleles. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.177, p.557-560, 1993.

WILSON, A.G.; SYMONS, J.A.; McDOWELL, T.L.; McDEVITT, H.O.; DUFF, G.W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.94, p.3195-3199, 1997.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals of Human Genetics**, London, v.19, n.4, p.251-253, 1955.

WU, C.Y.; DEMEURE, C.; KINIWA, M.; GATELY, M.; DELESPESE, G. IL-12 induces the production of IFN- γ by neonatal human CD4 T cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.151, n.4, p.1938-1949, 1993.

XIE, M-H.; AGGARWAL, S.; HO, W-H.; FOSTER, J.; ZHANG, Z.; STINSON, J.; WOOD, W.I.; GODDARD, A .D.; GURNEY, A .L. Interleukin(IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor related proteins CRF2-4 and IL-22R. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.275, p.31335-31339, 2000.

YAMADA H.; POLGAR, K.; HILL, J.A. Cell-mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent spontaneous abortion. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, New York, v.170, p.1339-1344, 1994.

YAMAMOTO, K.; QUELLE, F.W.; THIERFELDER, W.E.; KREIDER, B.L.; GILBERT, D.J.; JENKINS, N.A ; COPELAND, N.G.; SILVENNOIENEN, O ; IHLE, J.N. Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.14, n.7, p.4342-4349, 1994.

YAMAOKA, K.; OTSUKA, T.; NIIRO, H.; NAKASHIMA, H.; TANAKA, Y.; NAGANO, S.; OGAMI, E.; NIHO, Y.; HAMASAKI, N.; IZUHARA, K. Selective DNA-binding activity of interleukin-10-stimulated STAT molecules in human monocytes. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, Larchmont., v.19, p.679-685, 1999.

YANG, Y.; CHANG, J.F.; PARNES, J.R.; FATHMAN, C.G. T cell receptor (TCR) engagement leads to activation-induced splicing of tumor necrosis factor (TNF) nuclear pre-mRNA. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.188, p.247-254, 1998.

YE, J.; GHOSH, P.; CIPPITELLI, M.; SUBLESKI, J.; HARDY, K.J.; ORTALDO, J.R.; YOUNG, H.A. Characterization of a silencer regulatory element in the human IFN- γ promoter. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.269, n.41, p.25728-25734, 1994.

YOUNG, H.A.; GHOSH, P.; YE, J.; LEDERER, J.; LICHTMAN, A.; GERARD, J.R.; PENIX, L.; WILSON, C.B.; MELVIN, A.J.; MCGURN, M.E.; LEWIS, D.B.; TAUB, D.D. Differentiation of the T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN- γ gene. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.153, n.8, p.3603-3610, 1994.

YOUNG, H.A.; HARDY, K.J. Role of interferon- γ in immune cell regulation. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.58, n.4, p.373-381, 1995.

YOUNG, H.A.; ORTALDO, J.R. One-signal requirement for interferon-gamma production by human large granular lymphocytes. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.139, n 3, p.724-727, 1987.

YUI, J.; GARCIA-LLORET, M.; WEGMANN, T.G.; GUILBERT, L.J. Cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. **Placenta**, London, v.15, n.8, p.819-835, 1994.

ZDANOV, A.; SCHALK-HIHI, C.; GUSTCHINA, A.; TSANG, M.; WEATHERBEE, J.; WLODAWER, A. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon γ . **Structure**, London, v.3, p.591-601, 1995.

ZHIONG, Z.; WEN, Z.; DARNELL, J.E. JR. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. **Science**, Washington, v.264, n.5155, p.95-98, 1994.

INTERNET. Imagens. Disponíveis nos sites da Internet:

<http://www.onelambda.com;>

Imagem IL-10:

<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/vol2004/issue231/images/large/2312004re7F8.jpeg>, acesso em 10 de agosto de 2005;

Imagem TNF: <http://www.ntnu.no/~terjee/TNF.GIF>, acesso em 10 de agosto de 2005;

Imagem IFN- γ :

http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2004/warwick_robinson/interdim.jpg, acesso em 10 de agosto de 2005;

Imagem HLA classe II: [http://www.pd-](http://www.pd-fams.com/ja/product/KS/JPGs/20040611/TCR_MHC2_TSST_0.jpg)

[fams.com/ja/product/KS/JPGs/20040611/TCR_MHC2_TSST_0.jpg](http://www.pd-fams.com/ja/product/KS/JPGs/20040611/TCR_MHC2_TSST_0.jpg), acesso em 10 de agosto de 2005;

Mapa MHC: [http://www.anthonynolan.org.uk/.](http://www.anthonynolan.org.uk/); acesso em 10 de agosto de 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você está sendo convidado a participar:
como paciente ()
como controle () de um estudo intitulado "**DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELEVANTES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALO-ENXERTO**". É através das pesquisas, inclusive básicas, que ocorrem os avanços na Medicina, e sua participação é de fundamental importância.
- b) O objetivo desta pesquisa é tentar contribuir para que órgãos transplantados como o rim sejam melhor aceitos pelo receptor bem como contribuir para tentar esclarecer fenômenos relacionados aos abortos recorrentes de causas desconhecidas. E a participação de controles neste caso é de fundamental importância, pois através das comparações entre transplantes bem aceitos ou não é que poderemos chegar a fatos importantes, assim como entre aqueles casais com abortos de repetição e aqueles casais com número de dois ou mais filhos.
- c) Caso você participe da pesquisa, será necessário que você forneça uma amostra de sangue (10 ml).
- d) O único inconveniente que você poderá experimentar é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer, e que não causam dano a pacientes ou controles.
- e) Não há riscos para você.
- f) Para tanto você deverá comparecer ao LIGH, para a coleta do sangue.
- g) A pesquisadora responsável pelo projeto, Prof^a. Maria da Graça Bicalho - fone: 361-1729 poderá ser contactada no LIGH.
- h) Está garantido que você terá todas as informações que você queira, antes, durante e depois da pesquisa.
- i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar da pesquisa.
- j) As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas pelos

pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação ou por qualquer meio, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

- l)** Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são de responsabilidade dos pacientes ou controles.
- m)** Pela sua participação na pesquisa, você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- n)** Quando os resultados forem divulgados, não aparecerá seu nome e sim um código.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa para a qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona o fato relacionado à coleta de sangue e seus inconvenientes. Eu entendi que sou livre para interromper ou não participar da pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar desta pesquisa.

_____	___/___/___	_____	___/___/___
Assinatura do paciente/controle	Data	Pesquisador	Data

APÊNDICE 2 - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PELA TÉCNICA DE *SALTING-OUT* (LAHIRI et al., 1991)

1. Coletar 10 mL de sangue com EDTA a 1%.
2. Centrifugar a 2000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente para formar uma camada superficial de células (*buffy coat*).
3. Coletar a camada de células num tubo cônico Falcon de 15 mL e completar o volume com TKM1. O *buffy coat* coletado poderá também ser armazenado a -20°C para, em outro momento, descongelar e proceder à extração.
4. Adicionar 125 μ L (duas gotas aproximadamente) de IGEPAL CA630 (substitui o NONIDET-P40) e tampar o tubo.
5. Inverter sete vezes firmemente para misturar o detergente.
6. Centrifugar a 2500 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente.
7. Desprezar o sobrenadante invertendo o tubo lentamente, cuidar para manter o botão de células formado no fundo.
8. Completar para 10 mL com TKM1 e ressuspender o botão de células com Pipeta Pasteur. Finalizar com Vórtex por alguns segundos.
9. Centrifugar a 2500 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente.
10. Desprezar o sobrenadante.
11. Ressuspender delicadamente o botão com Pipeta Pasteur, adicionar 800 μ L de TKM2 e transferir para um tubo tipo Eppendorf.
12. Adicionar 50 μ L de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 10% e homogeneizar.
13. Incubar em banho-maria a 55 °C por pelo menos duas horas.
14. Ao retirar, adicionar 300 μ L de Cloreto de Sódio (NaCl) saturado a 6M e homogeneizar.
15. Centrifugar a 12000 rpm por 10-20 minutos a temperatura ambiente.
16. Verter o sobrenadante em um tubo de ensaio e descartar o precipitado de proteínas. O sobrenadante contém o DNA.

17. Adicionar dois volumes de Etanol 100%, gelado (estocado a -20°C até o momento do uso), tampar o tubo e inverter várias vezes até observar a formação de uma "nuvem branca" que é o DNA precipitado.
18. "Pescar" o DNA com ponteira de micropipeta e passar para um tubo tipo Eppendorf. Acrescentar 1 mL de etanol 70% para lavar (se o DNA estiver escuro pode-se lavar até três vezes). Homogeneizar e dispensar o etanol.
19. Colocar o tubo com DNA em estufa a 37°C até evaporação total do etanol restante ou deixar de um dia para outro (*overnight*) a temperatura ambiente.
20. Ressuspender o DNA em 200 μl de tampão TE ou água Milli-Q.
21. Levar ao banho-maria a 55°C por 45 minutos, para que o DNA reidrate.
22. Retirar do banho-maria e deixar a 4°C (geladeira) por três dias.
23. Homogeneizar e proceder a verificação da concentração ou estocar a -20°C .

ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



Curitiba, 02 de agosto de 2.001.

Ilmo (a) (s) Sr. (a)(s)
MARIA DA GRAÇA BICALHO DE LACERDA
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

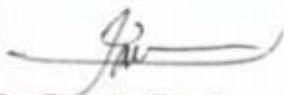
Comunicamos que o Projeto de pesquisa **"DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELEVANTES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALO-ENXERTO"**, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.

Protocolo CEP-HC nº 037ext.019/2001-07

O referido projeto foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 31 de julho de 2.001.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente



Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR

ANEXO 2 - FICHA DE ANÁLISE – CITOCINAS

WORKSHEET
Cytokine Genotyping Tray, Lot 4

Name: _____

Sex: ☐ Male ☐ Female

Sample ID: _____

Relationship to Patient: _____

DOB: _____

Age: _____

Weight: _____

Height: _____

Test Results:

TNF-α Results: _____

TGF-β1 Results: _____

IL-10 Results: _____

IL-6 Results: _____

IPN-γ Results: _____

Cat. # CYTOGEN

Tray Exp. Date: _____

Tray Lot #: _____

Order Lot # Batch #

POSITIONS	1H3H/ 5H7H/ 9H11H	1G2G/ 5G7G/ 9G11G	1F3F/ 5F7F/ 9F11F	1E2E/ 5E7E/ 9E11E	1D3D/ 5D7D/ 9D11D	1C2C/ 5C7C/ 9C11C	1B3B/ 5B7B/ 9B11B	1A3A/ 5A7A/ 9A11A	2H4H/ 6H8H/ 10H12H	2G4G/ 6G8G/ 10G12G	2F4F/ 6F8F/ 10F12F	2E4E/ 6E8E/ 10E12E	2D4D/ 6D8D/ 10D12D	2C4C/ 6C8C/ 10C12C	2A4A/ 6A8A/ 10A12A
RESULTS (mark positive locations)															
PRODUCT SIZE (bp)	750	125	125	175	175	125	125	300	300	300	300	250	250	175	250
SPECIFICITY															
TNF-α	GAG (low)	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α
IL-10	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)
IL-6	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)
IPN-γ	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)	GAG (low)

Test Performed by: _____ Date: _____

Read by: _____ Date: _____

Reviewed by: _____ Date: _____

Photo Documentation

One Lambda, Inc. 21001 Kibridge Bl., Canoga Park, CA 91303-2001 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-4904 Rev: 0. CYTOGEN_004_WB.XLS Page 1 of 1

ANEXO 3 - FICHA DE ANÁLISE – HLA-DQB1



WORKSHEET

Micro SSP™ Allele Specific HLA Class II DNA Typing Tray - DQB1, Lot #03A

Name _____

Sample ID _____

DQB1 Locus

DQB1 Locus		1/5/9								2/6/10								3/7/11								4/8/12							
		H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
Reaction Results (mark positive locations)																																	
Approximate Product Size (bp)		750	125	125	125 / 250	125	125	125	150 / 225	125	150	100 / 200	175 / 225	200	200	125	125	100	150	175	175	125	75	175	100 / 150	200	225	100 / 150	200 / 225	100 / 125	175 / 200	150	100
Serology Equivalent	DQB1 Locus Allele Group																																
N.C.	Negative Control (betaglobin)																																
DQ2	DQB1*0201																																
DQ2	DQB1*0202																																
DQ2	DQB1*0203																																
DQ7,DQ-	DQB1*030101~0102/13																																
DQ8	DQB1*030201																																
DQ8	DQB1*030202																																
DQ9	DQB1*030302																																
DQ9	DQB1*030303																																
DQ7	DQB1*0304																																
DQ8	DQB1*030501																																
DQ8	DQB1*030502																																
	DQB1*030503																																
DQ3	DQB1*0306																																
DQ-	DQB1*0307																																
DQ-	DQB1*0308																																
DQ-	DQB1*0309																																
DQ8	DQB1*0310																																
DQ-	DQB1*0311																																
DQ-	DQB1*0312																																
DQ4	DQB1*0401																																
DQ4	DQB1*0402																																
DQ5	DQB1*050101~0102																																
DQ5	DQB1*050201																																
DQ5	DQB1*050202																																
DQ5	DQB1*050301																																
DQ5	DQB1*050302																																
DQ5	DQB1*0504																																
DQ8	DQB1*060101~0103																																
DQ6	DQB1*0602																																
DQ6	DQB1*0603																																
DQ6	DQB1*060401~0402																																
DQ6	DQB1*060501~0502																																
DQ-	DQB1*0606																																
DQ-	DQB1*0607																																
DQ6	DQB1*0608																																
DQ6	DQB1*0609																																
DQ-	DQB1*0610																																
DQ1	DQB1*061101~1102																												</				



ONE LAMBDA, INC.

ANEXO 4 - FICHA DE ANÁLISE PARA TIPIFICAÇÃO DE *HLA-DR*

WORKSHEET Micro SSP™ High Resolution HLA Class II DNA Typing Tray, Lot #004		 <small>Cat. ID# SSP2H, LSSP</small>
<div style="border: 1px dashed black; height: 200px; margin: 0 auto; width: 80%;"></div> <p style="font-size: 1.2em; margin-top: 10px;">Photo Documentation</p>	<div style="text-align: right; font-size: 0.8em;"> <input type="checkbox"/> Patient <input type="checkbox"/> Male <input type="checkbox"/> Donor <input type="checkbox"/> Female </div> <div style="border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;">Name</div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"> Sample I.D. Race Birthdate ABO/Rh </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"> Disease Relationship to Patient </div>	
	<div style="border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;">Results</div>	
	<div style="border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;">Comments:</div>	
	<div style="border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"></div>	
	<div style="border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"></div>	
	<div style="border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"></div>	
	<div style="border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"></div>	
	<div style="border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"></div>	
	<div style="border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"></div>	
	<div style="border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"></div>	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Tray Exp. Date </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Tray Lot # </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> D-mix Lot #/Batch # </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> (384-Well Format Only) </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Load Position: <div style="display: flex; gap: 10px;"> <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="display: flex; gap: 10px;"> <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Test No.: </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between; border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"> Test Performed by Date </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"> Read by Date </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"> Reviewed by Date </div>		
<p style="font-size: 0.8em;"> Position 2B: 125 / 150 / 250 bps Position 11D: 150 / 175 / 225 / 250 bps Position 11C: 100 / 125 / 175 bps Position 11A: 150 / 200 / 275 bps Position 12H: 150 / 175 / 225 bps Position 12F: 150 / 175 / 200 / 250 bps Position 1C: 125 / 200 / 225 bps Position 2D: 100 / 150 / 175 / 225 bps Position 2B: 125 / 150 / 250 bps Position 3F: 100 / 125 / 200 / 225 bps Position 4D: 125 / 150 / 250 bps Position 4C: 150 / 175 / 200 bps Position 4A: 100 / 150 / 225 bps Position 5F: 175 / 200 / 225 / 250 bps Position 5B: 150 / 175 / 200 bps Position 6G: 100 / 175 / 225 / 275 bps Position 6E: 150 / 225 / 250 bps Position 6C: 125 / 175 / 200 bps Position 6H: 125 / 175 / 200 bps Position 6F: 100 / 175 / 250 bps Position 10B: 175 / 200 / 225 bps Position 11C: 100 / 125 / 175 bps Position 11A: 150 / 200 / 275 bps Position 12H: 150 / 175 / 225 bps Position 12F: 150 / 175 / 200 / 250 bps </p> <p style="font-size: 0.8em; margin-top: 5px;">Please refer to Primer Information document for revision information.</p> <p style="font-size: 0.8em; margin-top: 10px;">Nomenclature includes HLA alleles listed in the July 2004 update of the IMGT database (Robinson J, et al., "IMGT/HLA database - a sequence database for the human major histocompatibility complex." Tissue Antigen (2000) 55,280-287). Complete update information is located at www.anthonynolan.com/HLG/index.html.</p>		
<p>SSP2H_004_WS2 REV 3: PAGE 1 OF 7</p> <p style="font-size: 0.8em;">One Lambda, Inc. 21001 Kittridge Street, Canoga Park, CA 91303-2801 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-6904 www.onelambda.com</p> <p style="font-size: 0.8em;">Templ_SSP_WS2 Rev 3</p>		



Name

Sample ID

[illegible]

Reaction Results		(mark positive locations)
Approximate Product Size (bp)		
Serology Equivalent	DRB1 Locus Allele Group	
DR1	DRB1*010101-0103	
DR1	DRB1*010201-0203	
DR103	DRB1*0103	
DR1	DRB1*0104	
DR-	DRB1*0105/11	
DR-	DRB1*0106	
DR-	DRB1*0107	
DR-	DRB1*0108	
DR-	DRB1*0109	
DR-	DRB1*0110	
DR17 DR-	DRB1*030101028	
DR17	DRB1*030102	
DR18	DRB1*030201	
DR18	DRB1*030202	
DR18	DRB1*0303	
DR17	DRB1*0304	
DR17	DRB1*030501-0502	
DR3	DRB1*0306	
DR3	DRB1*0307	
DR-	DRB1*0308	
DR-	DRB1*0309	
DR17	DRB1*0310	
DR17	DRB1*0311	
DR3	DRB1*0312	
DR-	DRB1*0313	
DR3	DRB1*0314	
DR-	DRB1*0315	
DR-	DRB1*0316	
DR-	DRB1*0317	
DR-	DRB1*0318	
DR-	DRB1*0319	
DR-	DRB1*0320	
DR-	DRB1*0321	
DR-	DRB1*0322	
DR-	DRB1*0323	
DR-	DRB1*0324	
DR-	DRB1*0325	
DR-	DRB1*0326	
DR-	DRB1*0327	
DR6	DRB1*040101-0102	
DR6	DRB1*0402	
DR6	DRB1*040301	
DR6	DRB1*040302	
DR6	DRB1*0404	
DR6, DR-	DRB1*040501-0604445	
DR6, DR-	DRB1*040648	
DR6	DRB1*040701-0703	
DR6	DRB1*0408	
DR6	DRB1*0409	
DR6	DRB1*0410	
DR6	DRB1*0411	
DR-	DRB1*0412	
DR6	DRB1*0413	
DR6	DRB1*0414	
DR6	DRB1*0415	
DR6	DRB1*0416	
DR6	DRB1*0417	
DR-	DRB1*0418	
DR6	DRB1*0419	
DR6	DRB1*0420	
DR6	DRB1*0421	
DR6	DRB1*0422	
DR6	DRB1*0423	
DR6	DRB1*0424	
DR6	DRB1*0425	
DR6	DRB1*0426	
DR-	DRB1*0427	

Reaction Results (mark positive locations)

SSP2H_004_WS2 REV 3: PAGE 4 OF 7

DRB1Locus

		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
Reaction Results (mark positive locations)		H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
Approximate Product Size (bp)		-	200	200	200	200	200	200	200	175	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Serology Equivalent	DRB1 Locus Allele Group																								
DR11	DRB1*1109																								
DR11	DRB1*1110																								
DR11	DRB1*1111																								
DR-	DRB1*11201																								
DR-	DRB1*11202																								
DR11	DRB1*1113																								
DR11	DRB1*1114																								
DR-	DRB1*1115																								
DR11	DRB1*1116																								
DR-	DRB1*1117																								
DR-	DRB1*1118																								
DR11	DRB1*1119																								
DR11	DRB1*1120																								
DR11	DRB1*1121																								
DR-	DRB1*1122																								
DR11	DRB1*1123																								
DR-	DRB1*1124																								
DR11	DRB1*1125																								
DR11	DRB1*1126																								
DR11	DRB1*112701																								
DR11	DRB1*112702																								
DR-	DRB1*1128																								
DR11	DRB1*1129																								
DR-	DRB1*1130																								
DR-	DRB1*1131																								
DR-	DRB1*1132																								
DR-	DRB1*1133																								
DR-	DRB1*1134																								
DR-	DRB1*1135																								
DR-	DRB1*1136																								
DR-	DRB1*1137																								
DR-	DRB1*1138																								
DR-	DRB1*1139																								
DR-	DRB1*1140																								
DR-	DRB1*1141																								
DR-	DRB1*1142																								
DR-	DRB1*1143																								
DR-	DRB1*1145																								
DR-	DRB1*1146																								
DR-	DRB1*1147																								
DR-	DRB1*1148																								
DR-	DRB1*1150																								
DR-	DRB1*1152																								
DR-	DRB1*1153																								
DR12,DR-	DRB1*120101/110																								
DR12	DRB1*120102																								
DR12	DRB1*120201																								
DR12	DRB1*120202																								
DR12	DRB1*120302																								
DR5	DRB1*1204																								
DR12	DRB1*1205																								
DR12	DRB1*1206																								
DR-	DRB1*1207																								
DR-	DRB1*1208																								
DR-	DRB1*1209																								
DR13,DR-	DRB1*130101-0102/59																								
DR13	DRB1*130103																								
DR13	DRB1*130201-0202																								
DR13	DRB1*130301-0302																								
DR13	DRB1*1304																								
DR13	DRB1*1305																								
DR13	DRB1*1306																								
DR13	DRB1*130701																								
DR13	DRB1*130702																								
DR13	DRB1*1308																								
DR-	DRB1*1309																								
DR13	DRB1*1310																								

[illegible]

Reaction Results (mark positive locations)

SSP2H 004 WS2 REV 3: PAGE 7 OF 7